THESE de DOCTORAT D'ETAT

ès Sciences Naturelles

présentée

à l'Université Pierre et Marie Curie

Paris 6

par Melle TRINH THI TOAN HANH

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

Sujet de la thèse :

" Néoformation in vitro de fleurs chez Nicotiana : interaction noyau-cytoplasme chez des rétrocroisements et réduction chromatique additionnelle dans les méiocytes obtenus in vitro. Régénération d'hypohaploïdes par androgenèse ".

soutenue le 6 Décembre 1983

devant le jury composé de :

Melle CATESSON A.M.

Mme TRAN THANH VAN K.

MM CHAMPAGNAT P.

DEMARLY Y.

DULIEU H.

MIGINIAC E.

THESE de DOCTORAT D'ETAT

ès Sciences Naturelles

présentée

à l'Université Pierre et Marie Curie

Paris 6

par Melle TRINH THI TOAN HANH

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

Sujet de la thèse :

" Néoformation in vitro de fleurs chez Nicotiana : interaction noyau-cytoplasme chez des rétrocroisements et réduction chromatique additionnelle dans les méiocytes obtenus in vitro. Régénération d'hypohaploïdes par androgenèse ".

soutenue le 6 Décembre 1983

devant le jury composé de :

Melle CATESSON A.M.

Mme TRAN THANH VAN K.

MM CHAMPAGNAT P.

DEMARLY Y.

DULIEU H.

MIGINIAC E.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au laboratoire du Phytotron du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette et je tiens à exprimer toute ma profonde gratitude à Messieurs les Professeurs CHOUARD, CHAMPAGNAT et Monsieur JACQUES, Directeurs successifs du Phytotron pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire. A Monsieur le Professeur CHAMPAGNAT tout particulièrement, j'exprime ma profonde reconnaissance pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer, pour sa bienveillance et pour les encouragements qu'il m'a toujours accordés.

Madame TRAN THANH VAN, Maître de Recherche au C.N.R.S. m'a initiée à la Recherche en me prodiguant des conseils précieux et l'esprit d'amitié; elle m'a fait bénéficier des fructueux contacts avec de nombreux chercheurs, qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance.

Je remercie vivement Mademoiselle le Professeur CATESSON, Monsieur le Professeur MIGINIAC et Monsieur DULIEU, Maître de Recherche au C.N.R.S, qui ont accepté, malgré leurs nombreuses occupations, de juger ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur DEMARLY qui m'a fait de précieuses suggestions sur l'évolution à donner à mon travail et dont la compétence et l'ouverture au dialogue m'ont permis de découvrir quelques aspects importants de la génétique.

J'exprime également ma gratitude à Madame CHAMPAGNAT et Madame CLARKE, Mademoiselle VANNEREAU, Messieurs CIONINI, KNOX, GASPAR et VAZART qui se sont intéressés à mon travail et avec lesquels j'ai pu avoir de précieuses collaborations.

A mes collègues, à tout le personnel du laboratoire du Phytotron et à celui d'autres laboratoires de Gif , en particulier à Madame DEFOREIT, Madame JEHANNO, Monsieur MEUR, Monsieur CONREUR et Monsieur FLAMENT pour leur contribution à la réalisation de ce mémoire, je tiens à exprimer mes vifs remerciements.

Enfin, je dois beaucoup aux membres de l'équipe de Madame TRAN THANH VAN, en particulier Mademoiselle LEGRAIN, Monsieur MARCOTTE et Monsieur COUSSON qui m'ont soutenue par leur amitié et par leur aide précieuse et efficace.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	4
A. La floraison *in vivo*	4
1. Facteurs hormonaux et d'environnement	5
2. Facteurs génétiques	6
B. La néoformation de fleurs *in vitro*	8
1. Facteurs d'environnement	8
2. Facteursbio-chimiques	9
3. Nature de l'explant mis en culture	9
4. Facteurs génétiques	10
C. Production de plantes à partir d'anthères des fleurs formées *in vivo* et *in vitro*	11
1. Anthères formées *in vivo* sur la plante-mère	11
2. Anthères formées *in vitro*	14
MATERIELS ET METHODES	15
I. Conditions de culture des plantes-mères	15
II. Conditions des explants et des anthères	15
III. Techniques cytologiques	18
IV. Détermination de l'activité peroxydasique et du nombre d'isoenzymes de peroxydases	20
V. Détermination de la teneur en ADN	20
PREMIERE PARTIE: Formation de fleurs *in vitro* chez différents génotypes de *Nicotiana*	22
Chapitre I: Caractères principaux des génotypes utilisés pour la culture *in vitro*	22

A. N.tabacum L. et ses variétés 22

B. N.sylvestris et N. tomentosiformis 23

C. Hybrides interspécifiques 23

I. N.sylvestris x N.tomentosiformis 23

II. N.sylvestris x N.tabacum 25

III. N.tabacum x N.tomentosiformis 25

D. N.plumbaginifolia Viv. 25

E. Hybrides entre N.plumbaginifolia et N.tabacum 26

I. Etude morphologique 26

1. Hybrides utilisant N.plumbaginifolia comme parent maternel 26

2. Hybrides réalisés avec N.tabacum comme parent maternel 35

3. Conclusion 36

II. Etude cytologique 36

1. Observation des chromosomes sur des pointes de racines 36

2. Méïose dans des cellules-mères des tétraspores 37

F. Conclusion 40

Chapitre 2: Floraison in vitro à partir de couches cellulaires minces prélevées sur des ramifications florales de différents génotypes de Nicotiana 41

A. Réactions morphogénétiques comparées de couches cellulaires minces des différents génotypes de Nicotiana 41

I. Etude qualitative 41

1. Effet du milieu de culture 41

2. Effet de l'état physiologique de la plante-mère 43

II. Etude quantitative 44

1. Résultats obtenus avec N.tabacum, ses espèces parentales et leurs hybrides, et N.plumbaginifolia 44

2. Croisements entre N.plumbaginifolia et N.tabacum 44

III. Conclusion 48

B. Influence du niveau de ploïdie sur la formation de fleurs *in vitro* 48

I. Notion d'hypohaploïdie 48

II. Niveau de ploïdie et aptitude à la formation de fleurs *in vitro* 50

1. Influence de l'éclairement 51

2. Influence de la température 53

C. Conclusion 55

DEUXIEME PARTIE: Originalité de l'androgenèse obtenue à partir des anthères formées *in vitro* 57

A. *N.tabacum* variété Samsun 57

I. Plantes diploïdes 58

1. Cytologie des figures de méïose 58

2. Capacité embryogène des grains de pollen 58

a. Influence du stade d'évolution des grains de pollen 61

b. Influence du milieu de culture 61

c. Influence de la température 63

d. Influence de la lumière 63

II. Plantes haploïdes 63

1. Aspects morphologiques et cytologiques des plantes haploïdes 63

2. Capacité embryogène des grains de pollen 65

III. Plantes hypohaploïdes 67

1. Aspects morphologiques des plantes hypohaploïdes (de lère génération) 67

2. Aspects cytologiques 67

3. Capacité enbryogène des grains de pollen des plantes hypohaploïdes de lère génération 69

4. Quelques caractéristiques biochimiques de l'état hypohaploïde 70

IV. Conclusion 72

B. *N.plumbaginifolia* 72

I. Plantes diploïdes 72

1. Influence du stade d'évolution des grains de pollen sur l'androgenèse 72

2. Influence du milieu de culture sur l'androgenèse 74

II. Plantes haploïdes 74

1. Aspects morphologiques et cytologiques 74

2. Capacité embryogène des grains de pollen 76

III. Plantes hypohaploïdes 76

1. Aspects morphologiques et cytologiques 76

2. Remarques sur les plantes albinos obtenues parmi les plantes hypohaploïdes 80

a. Génétique du caractère albinos 80

b. Etude ultrastructurale 80

3. Teneurs en ADN mesurées par la méthode densitométrique 82

IV. Conclusion 82

C. Conclusion 83

DISCUSSION 86

I. Différenciation de fleurs in vivo 86

II. Différenciation de fleurs in vitro 87

III. Intérêt et particularité des anthères formées in vitro 93

IV. Quelques hypothèses suscitées par la culture d'ovules 95

CONCLUSION 97

PERSPECTIVES 98

BIBLIOGRAPHIE 100

Liste des abréviations

AIA	: acide 3- indolyl- acétique
AIB	: acide (indolyl- 3)- 4 butyrique
ADN	: acide desoxyribonucléique
BA	: benzyl- adénine
2- 4D	: acide 2- 4 dichlorophénoxyacétique
Kin	: Kinétine
MB	: milieu de base

INTRODUCTION

Dans la nature, toutes les plantes ne fleurissent ni au même rythme ni sous les mêmes climats. L'influence du photopériodisme, du thermopériodisme, des phytohormones et l'interaction de ces différents facteurs sur la floraison des plantes ont été étudiées depuis plusieurs décades. A côté de ces facteurs considérés comme classiques,il a été montré que des altérations dans les corrélations entre différentes parties d'une plante, entre différents territoires au sein d'un même méristème peuvent provoquer la floraison, indépendamment des exigences photopériodiques et thermopériodiques (TRAN THANH VAN, 1965; CHOUARD et TRAN THANH VAN, 1970). Cette influence déterminante des corrélations entre organes, tissus, cellules, sur la floraison et sur la morphogenèse en général a été confirmée depuis sur d'autres systèmes expérimentaux.

Il a été montré (MIGINIAC, 1971; SOTTA et MIGINIAC, 1975) que des corrélations entre le système racinaire et le système caulinaire jouent un rôle déterminant dans la floraison. CHLYAH (1974a) utilisant la technique des couches cellulaires minces mise au point par TRAN THANH VAN (1973), a montré que les potentialités morphogénétiques d'une couche cellulaire donnée ne peuvent s'exprimer qu'à la condition que cette assise soit en contact avec d'autres couches cellulaires sous-jacentes.

Par la suite, HANGOC (1975) a confirmé sur le Tabac, l'importance de corrélations intertissulaires sur l'expression florale in vitro des cellules cambiales et des cellules épidermiques et sous-épidermiques.

De plus, il a été montré que des corrélations intercellulaires au sein d'une même assise épidermique déterminent la proportion des cellules entrant en phase de synthèse de l'ADN et celle des cellules entrant en mitose

(CHLYAH, 1974a). L'on peut se demander si des nouvelles corrélations à l'intérieur de certaines cellules telles que les relations noyau-cytoplasme ne participeraient pas au contrôle de l'expression florale. Il est frappant de constater que des plantes de génotypes voisins ou de même génotype ne fleurissent pas de la même façon et ne présentent pas les mêmes potentialités de néoformation florale in vitro (TRAN THANH VAN et TRINH, 1978). Dans le but d'expliquer de telles variations morphogénétiques chez le Nicotiana, nous nous sommes efforcées de créer un certain nombre d'hybrides d'une part, divers degrés de ploïdie de certains génotypes d'autre part et nous mettons en jeu, de façon contrôlée, de nouvelles relations entre le noyau et le cytoplasme. Nous avons ensuite examiné leur répercussion sur la différenciation florale in vitro.

Plus précisément, chez certains Nicotiana, nous avons provoqué in vitro * une diminution progressive du nombre chromosomique d'un même génotype. Par ailleurs chez de nouveaux hybrides nous avons entrepris de faire varier le stock chromosomique des cellules et de modifier leur cytoplasme.

Pour chaque type de relation noyau-cytoplasme ainsi créé, nous avons étudié la différenciation florale in vivo et in vitro (première partie) et la capacité embryogène du pollen des anthères (deuxième partie). Les couches cellulaires minces sont utilisées comme modèle expérimental de culture in

---

* Remarque : pour faciliter la distinction entre in vivo et in vitro, nous allons qualifier de in vivo les plantes cultivées en serres ainsi que les fleurs et leurs anthères prélevées sur ces plantes.

Par contre, seront in vitro les fleurs et les anthères obtenues par la culture en tube de couches cellulaires minces.

vitro parce que la différenciation de fleurs est alors directe, sans cal intermédiaire (TRAN THANH VAN , 1973; TRAN THANH VAN et al., 1974; TRINH et TRAN THANH VAN, 1981). Donc, avec un tel système, le stock chromosomique des cellules ne varie pas de façon incontrôlée mais reste stable au cours de la culture, contrairement aux systèmes utilisés dans les travaux de MURASHIGE et NAKANO (1965) et MUIR (1965).

HISTORIQUE

Chez une plante entière, la différenciation de fleurs est sous la dépendance de différents facteurs: génétique, hormonal , photopériodique et thermique.

La néoformation *in vitro* de fleurs à partir d'un explant dépend non seulement de ces facteurs complexes mais encore du stade physiologique et du lieu de prélèvement de l'explant ainsi que de son conditionnement *in vitro* bien particulier. Aussi les deux types de fleurs formées *in vivo* et *in vitro* pourraient-ils présenter des propriétés différentes, notamment en ce qui concerne la capacité embryogène du pollen.

Dans cet historique, nous allons analyser successivement des études portant sur la floraison *in vivo* et *in vitro* et sur la production de plantes à partir de grains de pollen contenus dans les anthères de ces fleurs.

A. La floraison *in vivo*

Etant donné le grand nombre des travaux concernant la floraison *in vivo*, nous ne présentons ici d'exemples qu'à titre de comparaison avec la floraison *in vitro*.

Ainsi, nous analyserons des facteurs hormonaux et d'environnement qui permettent aux plantes entières de former des fleurs et des facteurs génétiques qui interviennent dans la fertilité des gamètes mâles et la réponse photopériodique.

1. Facteurs hormonaux et d'environnement

Le photopériodisme est l'un des facteurs les plus étudiés de la floraison. En principe, selon les exigences photopériodiques, les plantes sont classées en trois catégories: plantes de jours courts (JC), plantes de jours longs (JL) et plantes indifférentes (I). Cependant un certain nombre de plantes considérées comme strictement photopériodiques cessent de l'être si elles sont soumises à une température élevée (32°C, VAN DE VOOREN, 1969) ou basse (5°C, DERONNE et BLONDON, 1977).

L'exigence photopériodique peut être remplacée aussi par une application de gibbérelline chez le Bryophyllum daigremontianum (ZEEVAART et LANG, 1962) ou de benzyladénine chez le Pharbitis nil (OGAWA et KING, 1962).

CHAILAKHYAN et al. (1977) ont montré également qu'on peut remplacer l'exigence photopériodique par une application d'extrait de plantes induites. En effet, ces auteurs ont montré que chez la plante de jours courts Chenopodium rubrum, la floraison peut être induite à la lumière continue après une application d'un extrait de plantes (N. tabacum var. M.Mammoth) induites en jours courts.

Ainsi pour provoquer la floraison, on peut parfois remplacer un facteur externe par un autre ou par une application de phytohormones.

Par ailleurs,si en général, on considère que la floraison résulte d'une induction, CHOUARD et TRAN THANH VAN (1970) ont montré qu'une levée d'inhibition peut provoquer la floraison en l'absence de toute induction. En particulier, il a été montré chez le Geum urbanum que si toute inhibition corrélative est levée, tous les méristèmes de type gemmaire peuvent évoluer spontanément vers l'état floral.

2. Facteurs génétiques

Il existe des plantes supérieures originellement issues de croisements interspécifiques avec doublement chromosomique telles que N. tabacum ayant pour ancêtres N. sylvestris et N. tomentosiformis et Brassica napus ayant pour ancêtres Brassica campestris et Brassica oleracea. Chez ces hybrides, au cours de l'évolution, il y a eu adaptation parfaite entre les génomes nucléaires des deux espèces différentes et le cytoplasme de l'une d'elle. Cette adaptation se traduit par la fécondation, le développement de l'embryon et l'obtention de plantes fertiles (DEMARLY, 1977). Par contre, chez certaines plantes mâle-stériles à hérédité strictement maternelle (EDWARDSON, 1970; FRANKEL et GALUN, 1977) cette adaptation est absente. Parmi les plantes mâle-stériles cytoplasmiques d'angiospermes, les genres les plus étudiés sont le Maïs (DUVICK, 1965), le Coton (MEYER, 1975), le Blé (SAGE, 1976) et le Tabac. Chez le Tabac, la coexistence du génome nucléaire d'une espèce avec le cytoplasme d'une autre se traduit par des anomalies au niveau des pétales mais surtout au niveau des étamines (tableau 1). En suivant l'évolution de la morphologie florale et l'apparition de la stérilité mâle au cours des rétrocroisements successifs entre N. debneyi et N. tabacum, SAND (1968) et TSIKOV et ses collaborateurs (1977) ont pensé que la modification du phénotype floral et l'apparition de la stérilité mâle sont la résultante d'une interaction nucléo-cytoplasmique défavorable. En effet, l'introgression de fragments de chromosomes de N. debneyi dans le génome nucléaire de N. tabacum entraîne un retour vers une morphologie florale normale avec des anthères plus ou moins fertiles . La restauration des plantes mâle-stériles cytoplasmiques, grâce à l'intervention d'un chromosome maternel dans le génome paternel, est aussi observée chez les hybrides N. suaveolens x N. tabacum (SCHWEPPENHAUSER et MANN, 1968) et N. repanda x N. tabacum (GERSTEL et al. 1978).

Tableau 1. Expression morphologique des anthères associée à la stérilité mâle chez le Nicotiana (N. tabacum utilisé comme parent mâle). D'après Gerstel, 1980.

Espèces ayant donné le cytoplasme		Expression morphologique	Auteurs
section	espèce	des anthères	
Paniculatae	glauca	féminisation *	Berbec, 1974
Undulatae	undulata	pétaloïdie	Chaplin, 1964
Rusticae	rustica	pollen non fonctionnel	Hart, 1964 (cité par Smith, 1968)
Repandae	repanda	féminisation	Burk, 1967
Bigelovianae	bigelovii	anthères réduites	Burk, 1960
Alatae	plumbaginifolia	anthères réduites	Chaplin, 1964
Suaveolentes	suaveolens	féminisation	Izard et Hitier, 1955; Schweppenhauser et Mann, 1968
	megalosiphon	féminisation	Clayton, 1950
	goodspeedii	féminisation	Tsikov et al., 1977
	debneyi	féminisation	Clayton, 1950; Sand, 1968; Tsikov et Tsikova, 1971
	benthamiana	féminisation et pétaloïdie	Ramavarma et al., 1978

* Féminisation = anthères stigmatoïdes

Tels sont les facteurs qui interviennent dans la morphogenèse florale *in vivo*. La question qui se pose est de savoir si, *in vitro*, ces facteurs (hormonaux, d'environnement, génétiques) restent les mêmes ou s'il en existe d'autres.

B. La néoformation de fleurs in vitro

1. Facteurs d'environnement

La formation de fleurs *in vitro* présente des exigences précises en température et en photopériode. En effet, chez le *Torenia* (TANIMOTO et HARADA, 1979), le *Nicotiana* (TRINH et TRAN THANH VAN, 1981), un faible écart de température (2°C à 5°C) provoque une baisse de 50% du pourcentage d'explants formant des fleurs. Chez le *Cichorium intybus*, la formation de fleurs *in vitro* à partir de fragments de racines n'a été obtenue qu'après un traitement de froid (PAULET et NITSCH, 1964). Quant à la photopériode, la formation de fleurs *in vitro* a été obtenue chez le *Lunaria annua* (plante de jours longs), le *Streptocarpus nobilis* (plante de jours courts), le *Plumbago indica* (plante de jours courts) grâce à une application de photopériodes appropriées (PIERIK, 1966; ROSSINI et NITSCH, 1966; NITSCH et NITSCH, 1967).

Par ailleurs, l'exigence en photopériode peut être modifiée par un traitement chimique chez certaines plantes telles que le *Plumbago indica* qui peut former des fleurs *in vitro* même en jours longs en présence de méthionine ou d'éthylène (NITSCH, 1968), les mutants d'*Arabidopsis* (plante de jours longs) qui peuvent former des fleurs même à l'obscurité en présence d'une concentration élevée de sucre (REDEI, 1975).

L'exigence en photopériode peut être modifiée parfois par interaction des génotypes parentaux chez le *Nicotiana* (TRAN THANH VAN et TRINH, 1978).

2. Facteurs bio-chimiques

Chez le N. tabacum, TRAN THANH VAN et ses collaborateurs (1974) ont montré que des changements qualitatifs et quantitatifs de sucre, d'auxine et de cytokinine peuvent faire dévier l'induction florale: au lieu de produire des fleurs, l'explant donne soit des bourgeons végétatifs, soit des racines, soit des cals.

Par ailleurs, NITSCH et NITSCH (1967) ont montré que les gibbérellines, les auxines et certains de leurs précurseurs comme le tryptophane ou l'isatine peuvent inhiber la formation de fleurs chez le Plumbago indica.

3. Nature de l'explant mis en culture

Lors des premières expériences sur la floraison in vitro, certains auteurs ont utilisé l'apex prélevé sur la plante non induite (RAGHAVAN, 1961) ou induite (COLEMAN et NICKELL, 1964). Cette méthode est très simple . Il s'agit de guider l'évolution des méristèmes primaires vers l'état floral.

Par la suite, d'autres auteurs ont découvert que même des explants dépourvus de méristèmes tels que des fragments de tige de Nicotiana (CHOUARD et AGHION, 1961; AGHION-PRAT, 1965), de feuille de Streptocarpus (ROSSINI et NITSCH, 1966) et de racine de Cichorium (PAULET et NITSCH, 1964) peuvent former des fleurs in vitro.

La culture in vitro de différents types d'explants a permis de mettre en évidence l'influence de corrélations interorganiques, intertissulaires et intercellulaires sur la formation florale. Ainsi, chez le Scrofularia arguta (MIGINIAC, 1971) et le Chenopodium polyspermum (SOTTA et

MIGINIAC,1975), il a été montré que le système racinaire inhibe la floraison des bourgeons cotylédonaires. La culture in vitro de couches cellulaires minces de Tabac a montré l'influence de corrélations intertissulaires sur la formation de novo de fleurs: l'assise sous-épidermique ne pouvant néoformer des fleurs qu'à la condition d'être séparée du tissu cambial. Ce dernier, par contre, n'exprime cette potentialité qu'à la condition d'être maintenu en contact avec les assises épidermiques et sous-épidermiques (HANGOC, 1975).

Enfin, nous avons montré l'importance du stade physiologique de la plante-mère et du lieu de prélèvement des couches cellulaires minces sur l'aptitude à régénérer in vitro des fleurs : l'explant doit être prélevé au stade fruit vert terminal de l'inflorescence (TRAN THANH VAN et al.1974; KAMATE et al., 1981; TRINH et TRAN THANH VAN, 1981). Autrement dit, le tissu mis en culture doit avoir déjà subi une certaine évolution vers l'expression florale.Toutefois, on ne peut pas considérer qu'un tel tissu est induit, c'est-à-dire ayant déjà subi l'induction florale. En effet, un méristème induit est programmé pour exprimer une voie morphogénétique et une seule voie: la formation de fleurs . Ceci n'est pas le cas de couches cellulaires minces chez lesquelles il a été montré que l'on peut programmer plusieurs voies morphogénétiques (en particulier la formation de racines) en plus de la formation de fleurs. Par ailleurs, chez d'autres espèces (Torenia, par exemple) la formation de fleurs in vitro n'est pas uniquement obtenue chez les tissus prélevés sur des plantes en cours de floraison mais aussi chez les cotylédons (TRAN THANH VAN , 1981).

4. Facteur génétique

Au laboratoire, nous avons montré que dans des conditions expérimentales bien définies (photopériode, température, milieu de culture),

la formation de fleurs in vitro dépend de l'interaction génome-cytoplasme (TRAN THANH VAN et TRINH, 1978; KAMATE et al. 1981; TRINH et TRAN THANH VAN, 1983). Elle dépend également du niveau de ploïdie (TRINH, 1977).

C. Production de plantes à partir d'anthères des fleurs formées in vivo et in vitro

1. Anthères formées in vivo sur la plante-mère

De multiples recherches sur la culture d'anthères ont été réalisées. Cette technique permet actuellement d'obtenir des plantes haploïdes utilisées dans le but de créer des plantes homozygotes et des mutants.

YAMADA et al. (1963) sur le Tradescantia reflexa, puis GUHA et MAHESHWARI (1964, 1966) sur le Datura innoxia ont successivement obtenu des embryons qui se développent en plantes haploïdes à partir de grains de pollen contenus dans les anthères.

Par la suite, l'obtention des plantes haploïdes s'est étendue à d'autres espèces telles que le Tabac (tableau 2) ,le Riz (NIIZEKI et OONO, 1971), la Tomate (GRESSHOFF et DOY, 1972; CAPPADOCIA et RAMULU, 1980), le Pétunia (RAQUIN et PILET, 1972), l'Asperge (PELLETIER et al., 1972), le Blé (PICARD et BUYSER, 1975), le Brassica (KELLER et ARMSTRONG, 1977; KLIMASZEWSKA et KELLER, 1983), le Maïs (TING et al., 1981) et le Cocotier (NGUYEN et de GUZMAN, 1983).

Plusieurs facteurs agissent de façon plus ou moins importante sur la production de plantes à partir des grains de pollen mis en culture.

a. Stades cytologiques des grains de pollen

Chez le Blé (PICARD, 1973), le Géranium (ABO EL NIL et HILDERBRANDT , 1973), les grains de pollen au stade uninucléé sont plus favorables à l'androgenèse, alors que chez le Brassica (KAMEYA et HINATA, 1970), le stade

Tableau 2. Régénération de plantes à partir d'anthères mises en culture chez le Nicotiana.

Espèces	Stades de microspores utilisés	Origine des plantes	Auteurs
alata	U	E	Nitsch, 1969
attenuata	B	E	Collins et Sunderland, 1974
clevelandii	U	E	Vyskot et Novak, 1974
knightiana	B	E	Collins et Sunderland, 1974
glutinosa	B	E	Nitsch, 1969
otophora	B	E	Collins et al. 1972
paniculata	U	E	Nakamura et Itagaki, 1973
plumbaginifolia	U	E	Novak et Vyskot, 1974
raimondii	B	E	Collins et Sunderland, 1974
rustica	U	E	Nitsch et Nitsch, 1969
sanderae	U	E	Vyskot et Novak, 1974
sylvestris	U	E	Bourgin et Nitsch, 1967
tabacum	U	E	Bourgin et Nitsch, 1967
tabacum	T	E	Nakata et Tanaka, 1968
suaveolens x langsdorfii	B	C	Guo, 1972
sanderae x alata	U	E	Vyskot et Novak, 1974

- E : embryon ; C : cals; U : unicluéé; B : Binucléé; T : Tétrade.

le plus favorable est le stade binucléé. Cependant, chez une même espèce, le stade favorable peut être modifié par les conditions de culture des plantes-mères et des anthères. Chez le Tabac, le stade le plus favorable peut être le stade binucléé (BOURGIN et NITSCH, 1967, COLLINS et SUNDERLAND, 1974), uninucléé (NAKAMURA et ITAGAKI, 1973; VYSKOT et NOVAK, 1974) ou tétrade (NAKATA et TANAKA, 1968).

b. Milieu de culture

Pour obtenir la formation de plantes à partir de grains de pollen, le milieu de culture peut être composé seulement d'eau et d'agar (MATSUBAYOSHI et MISOO, 1977) ou additionné de Fer et de 2% de saccharose (NITSCH, 1971). Mais il peut être aussi très complexe et composé de différents macro- et micro-éléments de WHITE (1943), de NITSCH (1951), de MURASHIGE et SKOOG (1962), additionné de cytokinine et d'auxine (NIIZIKI et OONO, 1971; RAGHAVAN, 1976) et de lait de coco (ABO EL NIL et al., 1976).

c. Origine des plantes issues des grains de pollen mis en culture

Les plantes issues de grains de pollen peuvent avoir trois origines:

- soit la cellule végétative du pollen comme chez le Nicotiana (VAZART, 1973), le Triticum aestivum (WANG et al., 1973) et l'Hordeum vulgare (CLAPHAM, 1971).
- soit la cellule génératrice du pollen comme chez l'Hyoscyamus niger (RAGHAVAN, 1976)
- soit à la fois les cellules végétative et génératrice comme chez le Datura innoxia (SUNDERLAND et DUNWELL, 1974).

Par ailleurs, les plantes peuvent être formées directement à partir des grains de pollen (cas du Tabac et du Petunia) ou seulement après une phase callogène (cas du Riz et de la Tomate).

Dans l'androgenèse, la différenciation des plantes n'est donc pas du même type chez toutes les espèces. Aussi, les plantes régénérées à partir de grains de pollen ne présentent pas le même niveau de ploïdie.

Ainsi, chez le Nicotiana, la plupart des plantes obtenues à partir de culture d'anthères sont haploïdes alors que chez le Datura, le Riz , le Petunia et le Brassica , les plantes présentent différents niveaux de ploïdie (de haploïde à pentaploïde).

2. Anthères formées in vitro

Dans toutes les études faites jusqu'à présent, les auteurs ont uniquement étudié les grains de pollen des anthères contenues dans les fleurs formées à la fin du cycle de développement de la plante-mère.

Dans notre thèse de 3ème cycle, nous avons montré que chez le N. tabacum var. W.38, les anthères formées in vitro à partir de couches cellulaires minces sont, non seulement capables de régénérer des plantes haploïdes comme les anthères formées sur la plante-mère, mais qu'elles ont encore d'autres propriétés particulières (TRINH, 1977). Ces propriétés seront étudiées dans la deuxième partie de ce mémoire.

MATERIELS et METHODES

I. Conditions de culture des plantes-mères

Les espèces et les hybrides de Nicotiana étudiés (tableaux 4 et 5) sont généralement cultivés aux superserres à 24°C sous une humidité relative de 65%. La photopériode appliquée aux plantes-mères est de 9h pour les plantes de jours courts et de 16h pour les plantes indifférentes ou de jours longs . Pour étudier l'influence de l'éclairement sur la stérilité des plantes mâle-stériles cytoplasmiques, d'autres conditions sont utilisées (éclairements de 9h, 16h, 24h et températures de 12°C, 17°C, 22°C, 24°C, 27°C). Dans notre étude, seules les espèces présentant une exigence absolue en jours longs ou en jours courts sont dites de jours longs ou de jours courts. Ainsi, toutes les plantes préférantes, finissant par fleurir tant en jours longs qu'en jours courts, sont classées comme indifférentes.

II. Conditions de culture des explants et des anthères

1. Matériels utilisés.

Afin de comparer la capacité de formation florale in vivo et in vitro de différents génotypes de Nicotiana et la capacité d'androgenèse et de gynogenèse de ces plantes, les matériels utilisés pour la culture in vitro sont les suivants:

- des anthères

- des ovules non fécondés

- des explants de 1 mm x 10 mm formés de 3 à 6 assises de cellules épidermiques, sous-épidermiques et parenchymateuses. Ces explants, appelés "couches cellulaires minces",sont obtenus par une coupe tangentielle effectuée sur les ramifications florales à un stade bien défini de la floraison.

2. Milieux de culture.

Les milieux de culture utilisés pour les anthères et les explants sont le milieu de base (MB) composé des macro- et micro-éléments de MURASHIGE et SKOOG (1962), de myo-inositol (100 mg/l) , de thiamine-HCl (0,4 mg/l) , de saccharose (30 g/l) et de gélose (10 g/l) , additionné de différentes substances de croissance (tableau 3).

Pour la culture des fragments de feuilles, des ovaires et des ovules non fécondés, le milieu de base (MB) est aussi utilisé en ajoutant de l'AIA (10^{-5}M) et de la BA (10^{-5}M).

3. Conditions d'environnement.

Les anthères , les couches cellulaires minces et les fragments de feuilles mis en culture sont placés à une température variant entre 24°C et 27°C sous une humidité relative de 50%. Un éclairement de 50 W m^{-2} leur est appliqué. Les explants prélevés sur les plantes de jours courts, de jours longs et indifférentes ont été soumis à des photopériodes de 9h, 16h et 24h. En effet, une étude préliminaire montre que la photopériode de 24h permet

Tableau 3. Concentrations optimales (en sucre et en substances de croissance) pour obtenir différents programmes morphogénétiques chez les couches minces de cellules épidermiques et sous-épidermiques de N. tabacum var. Wisconsin 38 (d'après TRAN THANH VAN et al.,1974)

Programmes morphogénétiques	Concentrations		Rapport auxine/cytokinine
	Saccharose (en g/l)	Substances de croissance (en moles)	
Cal	30	2.4 D 5.10^{-6} Kin 10^{-7}	50
Bourgeons	30	AIA 10^{-6} BA 10^{-5}	0.1
Racines	10	AIB 10^{-5} Kin 10^{-7}	100
Fleurs	30	AIA 10^{-6} Kin 10^{-6}	1

l'expression d'un nombre plus élevé de fleurs par explant (chez les plantes de jours longs et indifférentes). Pour étudier l'influence de la température sur la formation de fleurs in vitro et sur la production des plantes haploïdes, d'autres conditions phytotroniques sont utilisées (12°C, 17°C, 22°C, 24°C, 27°C)

4. Obtention des plantes amphidiploïdes

La culture de fragments de feuilles des hybrides réciproques N. plumbaginifolia x N. tabacum (PT ou TP) est réalisée dans le but d'obtenir des plantes amphidiploïdes (PPTT ou TTPP) (tableau 5).

Les fragments de feuilles de ces hybrides (PT ou TP) sont cultivés sur le milieu de base additionné d'AIA (10^{-5}M) et de BA (10^{-5}M). Au bout de 4 semaines, les bourgeons sont néoformés sur le limbe. Transférés ensuite sur un milieu dépourvu de substances de croissance , ils forment des racines. On obtient alors des plantules dont le nombre de chromosomes se trouve être doublé par endomitose. Ensuite ces plantules sont mises en pots et cultivées en superserres.

III. Techniques cytologiques

1. Histologie

Les boutons floraux aux différents stades de développement de N.tabacum x N.plumbaginifolia sont fixés au fixateur F.A.A. (formaldéhyde: 1 volume, acide acétique: 1 volume et alcool éthylique 70°: 18 volumes) pendant 24 h ou plus. Les échantillons sont ensuite lavés à l'eau courante pendant 24h puis déshydratés par plusieurs solutions d'éthanol à concentration de plus en plus élevée, puis lavés dans 3 bains de toluène. Les échantillons, après

inclusion dans la paraffine, sont coupés en sections de 7 µ et colorés par le mélange vert de méthyle/pyronine . Les tests à l'ADNase et l'ARNase montrent que, sur notre matériel, seuls l'acide désoxyriboucléique (ADN) est coloré par le méthyle et l'acide ribonucléique (ARN) est coloré par la pyronine.

2. Comptage des chromosomes

Le comptage des chromosomes est effectué sur les pointes de racines. Diverses étapes de la méïose ont également été étudiées au niveau des microspores. Les pointes de racines, prétraitées dans la colchicine (0,1%) pendant 2h, et les anthères sont fixées dans l'alcool acétique (3:1) puis colorées au carmin acétique ferrique.

3. Ultrastructure (en collaboration avec Mlle Vannereau, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry)

Les fragments de limbes foliaires sont prélevés dans une solution de glutaraldéhyde à 6% dans du tampon cacodylate pH 7,2 et préfixés 1/4h sous vide. Cette préfixation est suivie par une fixation dans la glutaraldéhyde à la même concentration pendant 12h à 4°C. Les échantillons sont ensuite postfixés par une solution de tetroxyde d'osmium à 2% dans du tampon cacodylate, à 4°C, pendant 12h. Après lavage et déshydratation dans l'acétone, ils sont inclus dans de l'Epon.

Les coupes sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution aqueuse et par le citrate de plomb (VENABLE et COGGESHALL, 1965), puis observées avec un microscope Philips EM 301.

IV. Détermination de l'activité peroxydasique et du nombre d'isoenzymes de peroxydases

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Dr. GASPAR, Université de Liège (Belgique).

Les échantillons se composent de 2 à 3 feuilles adultes prélevées au milieu de la tige*. Douze plantes, en moyenne, ont été utilisées pour chaque expérience. A partir de 75 mg de matériel tissulaire, les extraits enzymatiques bruts sont préparés dans 1,5 ml de tampon phosphate 0,06 M à pH 7,0 et 2°C selon la méthode utilisée par GASPAR et ses collaborateurs (1973).

Le macérat est centrifugé à 25000 g pendant 10 mn et le surnageant est utilisé pour la détermination enzymatique. Les peroxydases liées aux parois n'ont pas encore été étudiées.

L'activité peroxydasique est déterminée par spectrophotométrie: l'augmentation de l'absorbance à 420 nm (GASPAR et al., 1973) est mesurée à partir d'un mélange réactionnel comprenant 8 ml de tampon phosphate à pH 6,1, 1 ml d'H_2O_2 (0,2 volume), 1 ml de guaïcol à 1% et 0,2 ml de l'enzyme.

La teneur en protéine du matériel est déterminée par la méthode de Folin phénol (LOWRY et al., 1951).

Les zymogrammes d'isoperoxydases sont déterminés par électrophorèse sur gel vertical d'amidon. Les gels sont au préalable étalonnés soit en équivalents de protéine soit en poids sec (DARIMONT et GASPAR, 1972). La migration électrophorétique a lieu à 400V à 0°C pendant 3 à 4h. Les gels sont révélés soit à la benzidine soit à l'O-dianisidine.

VII. Détermination de la teneur en ADN

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Dr. CIONINI, Université de Pise,(Italie).

---

*Plantes au stade végétatif.

Les fragments de feuilles de N. plumbaginifolia diploïde, haploïde et hypohaploïde sont fixés dans l'alcool acétique (3:1) puis macérés dans une solution à 5% de pectinase à 37°C pendant 40 mn. Ils sont ensuite écrasés dans une goutte d'acide acétique puis hydrolysés pendant 10 mn à la température ambiante par de l'acide chlorhydrique 5N avant d'être colorés par le réactif de Schiff. Puis, ils sont rincés dans 3 bains de SO_2 (10 min par bain) et à l'eau courante pendant 20 min. Après déshydratation, les préparations sont montées dans du D.P.X. (Baume). Cent noyaux de chaque échantillon sont mesurés à 550 nm. Le contenu en ADN des noyaux est mesuré par microdensitométrie (appareil Barr et Stroud, type GN5). La valeur 4c des cellules méristématiques de racines est déterminée en faisant des mesures au niveau des plaques métaphasiques.

PREMIERE PARTIE

Formation de fleurs *in vitro* chez différents génotypes de *Nicotiana*

Pour étudier l'aptitude à former des fleurs *in vitro* de certaines espèces de *Nicotiana* et la transmission de cette aptitude à leurs descendants, nous avons réalisé une série de croisements entre elles. Parmi les plantes-mères issues des divers croisements, certaines présentent une morphologie très particulière, observée pour la première fois, et qui mérite une étude détaillée.

CHAPITRE 1

CARACTERES PRINCIPAUX DES GENOTYPES UTILISES POUR LA CULTURE *IN VITRO*

A. *N. tabacum* L. *et ses variétés* (2n = 48)

Outre la variété Wisconsin 38 (W.38) utilisée pour notre thèse de 3e cycle, nous avons choisi trois autres variétés (Samsun, Xanthi, Lacerata) indifférentes au photopériodisme et une variété (Maryland Mammoth) à exigence de jours courts absolue.

Les fleurs de ces 5 variétés sont identiques au point de vue couleur (fleurs rose foncé) et forme, excepté pour le Lacerata où les sépales sont absents. On distingue, par ailleurs, ces 5 variétés entre elles par les caractères foliaires, feuilles sessiles ou pétiolées (tableau 4).

Seule la variété Samsun (Photo 1) a été choisie dans tous les croisements utilisant N. tabacum.

B. N. sylvestris (2n = 24) et N. tomentosiformis (2n = 24)

Ce sont les espèces parentales de N. tabacum . N. sylvestris est une plante à exigence de jours longs absolue avec des fleurs blanches et des feuilles sessiles, tandis que N. tomentosiformis est une plante à exigence de jours courts absolue avec des fleurs jaune-rosâtre et des feuilles sessiles (tableau 4).

C. Hybrides interspécifiques

I. N. sylvestris x N. tomenfosiformis (2n = 24)

Le but poursuivi ici est de comparer l'aptitude à former des fleurs in vitro d'un hybride naturel stabilisé depuis longtemps (N. tabacum) avec celle de l'hybride amphidiploïde récemment créé (N. sylvestris x N. tomentosiformis). Ce dernier est une plante à exigence de jours longs absolue avec des fleurs rose pâle (Photo 2) et des feuilles sessiles (Photo 3). Ses grains de pollen et ses ovules sont stériles (tableau 4). Il aurait été intéressant de comparer son aptitude à former des fleurs in vitro avec celle de plantes issues du croisement réciproque. Malheureusement nous n'avons pu réaliser un tel croisement à cause de l'incompatibilité pollen-stigmate.

Tableau 4. Caractéristiques des plantes-mères de différents génotypes de Nicotiana.

Génotype	2n	Réaction à la photopériode	Caractère des feuilles	Couleur des fleurs	Viabilité des gamètes ♂	Viabilité des gamètes ♀
N.tabacum var. W.38	48	I	S	Rose foncé	f	f
Samsun	48	I	P	Rose foncé	f	f
Xanthi	48	I	P	Rose foncé	f	f
Lacerata	48	I	S	Rose foncé	f	f
Maryland Mammoth	48	JC	S	Rose foncé	f	f
N.plumbaginifolia	20	I	S	Violacé pâle	f	f
N.sylvestris	24	JL	S	Blanche	f	f
N.tomentosiformis	24	JC	S	Jaune-rosâtre	f	f
N.sylvestris x N.tomentosiformis	24	JL	S	Rose pâle	s	s
2(N.sylvestris x N.tomentosiformis)	48	JL	S	Rose pâle	f	s
N.sylvestris x N.tabacum	36	I	i	Rose	f	f
N.tabacum x N.sylvestris	36	I	i	Rose	s	s
N.tabacum x N.tomentosiformis	36	I	i	Rose	s	s

I = plante indifférente ; JC = plante de jours courts ; JC = plante de jours longs

s = feuille sessile ; P = feuille pétiolée; i = feuille à forme intermédiaire par rapport à celle des parents

f = fertile ; s = stérile — 2n= nombre de chromosomes somatiques.

II. N. sylvestris x N. tabacum (2n = 36)

Cet hybride est indifférent au photopériodisme. Il porte des fleurs roses (Photo 4) et des feuilles à forme intermédiaire par rapport à celles des parents (Photo 5). Ses fleurs ont des grains de pollen et des ovules fertiles, alors que celles de l'hybride issu du croisement réciproque ont des grains de pollen et des ovules stériles (tableau 4).

III. N. tabacum x N. tomentosiformis (2n = 36)

Cet hybride est indifférent au photopériodisme. Il a des fleurs roses (Photo 6) et des feuilles intermédiaires par rapport à celles des parents (Photo 7). Ses grains de pollen et ses ovules sont stériles (tableau 4).

Le croisement réciproque n'a pu être obtenu.

D. N. plumbaginifolia Viv.(2n = 20)

C'est une espèce indifférente au photopériodisme et à caryotype simple (tableau 4) avec des marqueurs génétiques intéressants bien connus (CAMERON et MOAV, 1957). Le génome de N.plumbaginifolia possède des gènes capables de complémenter les mutations ws_1 et ws_2 de l'espèce N. tabacum, des gènes dominants dans l'hybride avec N.tabacum (couleur des fleurs, avortement pollinique). Ce génotype a des fleurs violacé-pâle et des feuilles sessiles (Photo 8).

E. Croisements entre N. plumbaginifolia et N. tabacum

I. Etude morphologique (tableau 5)

1. Générations réalisées avec N. plumbaginifolia comme parent maternel

a. Hybrides interspécifique (pbg x tab)* et amphidiploïde 2(pbg x tab)

Ces hybrides ont des feuilles (Photo 10) et des fleurs (Photo 9) dont la couleur et la forme sont intermédiaires par rapport aux deux espèces parentales. Ils ont des étamines et des ovaires à forme normale mais les grains de pollen et les ovules sont stériles chez l'hybride interspécifique. Par contre, les pollens et les ovules sont fertiles chez l'hybride amphidiploïde.

b. Générations BC_1 = 2 (pbg x tab) x tab et $B'C_1$ = 2 (pbg x tab) x pbg

Ces génotypes sont obtenus en croisant l'hybride amphidiploïde par le pollen de N. tabacum ou de N. plumbaginifolia . La couleur et la forme de la corolle de ces hybrides sont intermédiaires par rapport à celles des deux espèces parentales. Les étamines sont normales avec un petit nombre de grains de pollen fertiles. Les ovaires sont normaux avec des ovules fertiles.

c. Générations résultant de rétrocroisements successifs

Selon les pollens utilisés (N. tabacum ou N. plumbaginifolia), les modifications morphologiques des fleurs observées sont plus ou moins importantes.

---

* pbg : N.plumbaginifolia ; tab :

Tableau 5.Description morphologique des fleurs chez le N.plumbaginifolia, le N.tabacum et leurs hybrides.

Génération	Croisement réalisé	Cyt	Morphologie florale		Morphologie des étamines	Viabilité des gamètes	
			couleur des pétales	forme des pétales		♂	♀
AF	pbg x pbg	pbg	violacé pâle (Vp)	étoilée	normale	+	+
AF	tab x tab	tab*	rose foncé (Rf)	pentagonale	normale	+	+
F_1	pbg x tab	pbg	intermédiaire	intermédiaire	normale	-	-
Amphidiploïde	2(pbg x tab)	pbg	intermédiaire	intermédiaire	normale	+	+
RC_1	2(pbg x tab) x tab	pbg	intermédiaire	intermédiaire	normale	+(ε)	+
RC_2	[2(pbg x tab) x tab]x tab	pbg	Rf	étoilée	a.st., a.st.ov. (a)	-	+
Croisement réciproque	tab x [2(pbg x tab) x tab]	tab*	Rf	pentagonale	normale	+	+
RC_3	{[2(pbg x tab) x tab] x tab} x tab	pbg	Rf	étoilée	a.st., a.st.ov. (a)	-	+
$B'C_1$	2(pbg x tab) x pbg**	pbg	intermédiaire	intermédiaire	normale	+(ε)	+
$B'C_2$	[2(pbg x tab) x pbg] x pbg**	pbg	Vp	étoilée	normale	+	+
$B'C_3$	{[2(pbg x tab) x pbg] x pbg} x pbg**	pbg	Vp	étoilée	normale	+	+
F'_1	tab x pbg**	tab*	intermédiaire	intermédiaire	normale	-	+
Amphidiploïde	2(tab x pbg**)	tab*	intermédiaire	intermédiaire	normale	+	+
B_1C_1	2(tab x pbg) x tab	tab*	intermédiaire	intermédiaire	normale (b)	+(ε)	+
B_2C_2	[2(tab x pbg) x tab] x tab	tab*	Rf	pentagonale	normale (b)	+	+
$B'_1C'_1$	2(tab x pbg) x pbg**	tab*	intermédiaire	intermédiaire	normale	+	+
$B'_2C'_2$	[2(tab x pbg) x pbg] x pbg**	tab*	Vp	pentagonale	normale	+	+

Cyt = cytoplasme

* cytoplasme N.tabacum

**génome N.plumbaginifolia

(a) a.st.: anthère stigmatoïde; a.st.ov. : anthère stigmatoïde portant des ovules nus.

(b) quelques anthères pétaloïdes sont observées.

+ (ε) un petit nombre de grains de pollen viables observés

+ présence

α - N. tabacum comme parent paternel

α_1 - Génération BC_2= [2 (pbg x tab) x tab] x tab

Ce génotype est obtenu en croisant le BC_1 femelle avec le pollen de N. tabacum. Les modifications morphologiques sont importantes avec des fleurs rose foncé (caractère du parent mâle) à limbe étoilé (caractère du parent femelle). Les anthères de ces fleurs sont très anormales. Elles forment rarement des petits sacs polliniques dans lesquels les grains de pollen ne sont pas capables de germer . Certaines cellules périphériques de ces anthères se divisent pour former des papilles stigmatiques analogues à celles qu'on observe sur le stigmate d'où le nom d'anthère stigmatoïde utilisé dans la littérature. La réaction la plus curieuse est la formation d'ovules nus sur les parties périphériques de ces "étamines" modifiées (Photo 11). Ces ovules nus ont une structure normale avec deux téguments et un nucelle bien développé. Dans ce nucelle se différencie la cellule-mère des macrospores (Photo 14). On observe ensuite l'avortement classique de 3 cellules sur 4 (Photo 15) et dans un certain nombre de cas, la différenciation de la macrospore restante (Photo 16) en un sac embryonnaire à 8 noyaux (Photo 17).

L'ovaire est normal, il s'y forme un très grand nombre d'ovules normaux.

Nous avons comparé les tailles,les teneurs en ADN, et la capacité embryogène des ovules nus et des ovules normaux (ovules ovariens).

- Taille :

Le coefficient de corrélation r_1 = 0.46 (ovules nus) et r_2 = 0.38 (ovules normaux) calculés (fig.1) montrent qu'il y a une faible corrélation

Fig.1. Corrélation entre les longueurs et les largeurs des sacs embryonnaires des ovules nus (1) et des ovules normaux (2) de BC_2 = [2(pbg x tab) x tab] x tab

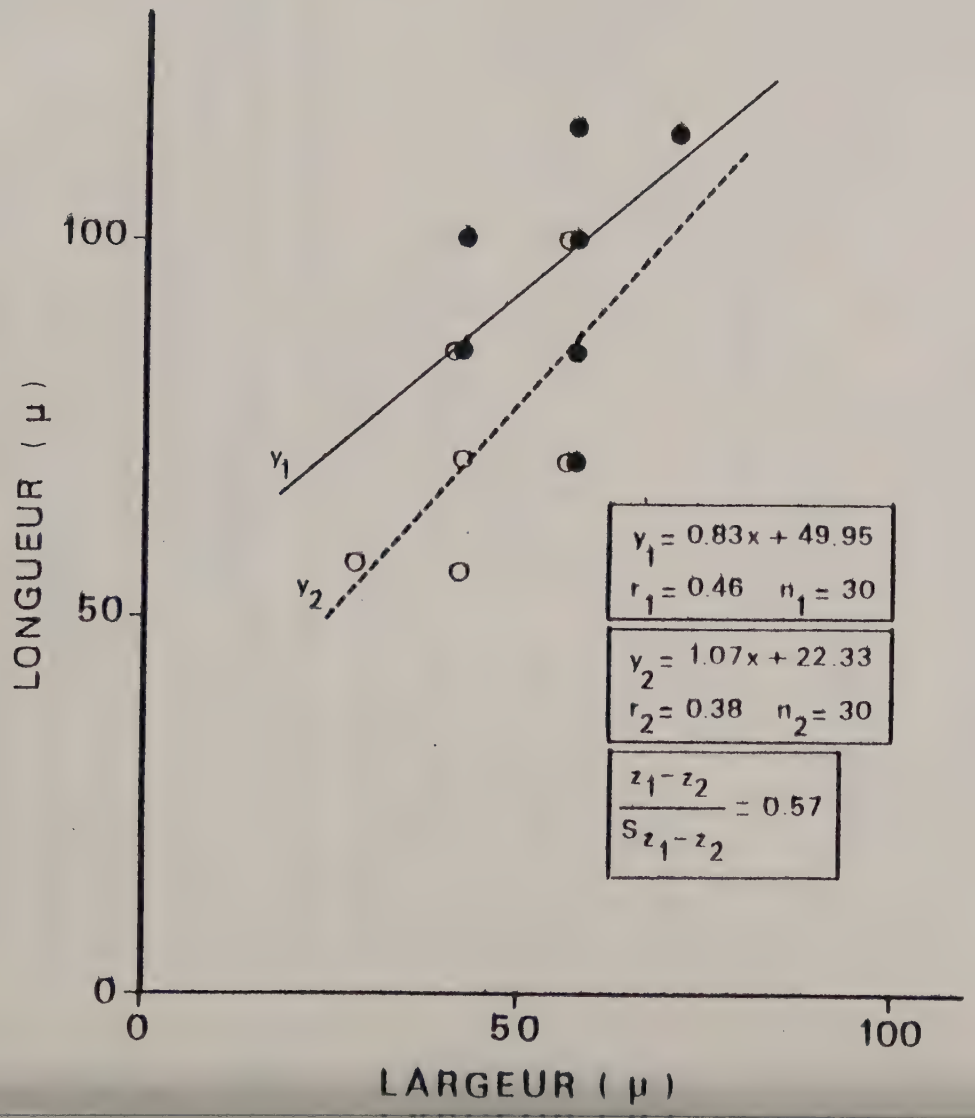
● ovules nus (1)

○ ovules normaux (2)

y = droite de régression

r = coefficient de corrélation

n = nombre des ovules observés


100
50
0
0
50
100
LONGUEUR (µ)
LARGEUR (µ)
y_1
y_2
$y_1 = 0.83x + 49.95$
$r_1 = 0.46 \quad n_1 = 30$
$y_2 = 1.07x + 22.33$
$r_2 = 0.38 \quad n_2 = 30$
$\frac{z_1 - z_2}{S_{z_1 - z_2}} = 0.57$

positive (r_{limite} = 0.35) entre les longueurs et les largeurs des sacs embryonnaires des ovules nus et des ovules normaux. La comparaison de deux coefficients de corrélations ($Z_1 - Z_2 / S_{Z1 - Z2} = 0.57 < 2$) indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les ovules nus et les ovules normaux en ce qui concerne l'association des paramètres longueur et largeur.

Si l'on compare la moyenne des longueurs (L) d'une part et celle des largeurs (l) d'autre part des ovules nus (m_1) et des ovules normaux (m_2), on constate que la différence des moyennes est significative

$m_{1L} = 97.62 \pm 3.88$ $\quad t_L = m_1L - m_2L/Sd = \underline{45.72}$

$t_{0.05} = 2$

$m_2L = 69.23 \pm 5.50$

$m_1l = 59.11 \pm 2.15$

$t_l = m_1l - m_2l/Sd = \underline{2.23}$

$t_{0.05} = 2$

$m_2l = 45.69 \pm 1.66$

- Teneurs en ADN (fig.2 et 3):

Par la méthode densitométrique on ne peut déceler de différence entre les teneurs en ADN des cellules-mères des macrospores des ovules nus et des ovules normaux: chez les 3 plantes testées, la majorité des noyaux mesurés présentent une teneur en ADN de 2C, que les ovules soient nus ou normaux.

Cette étude confirme que les ovules nus sont normaux, la seule différence entre les ovules normaux et les ovules nus étant une taille plus grande de ces derniers.

Une même ébauche d'étamine peut donc former à la fois des cellules-mères des tétraspores, des parties analogues au stigmate, des parties analogues au placenta portant des ovules nus et aussi des appendices

Fig.2. Teneurs en ADN mesurées chez les ovules nus (N) de BC_2 = [2(pbg x tab) x tab] x tab

N_1 = plante n°1

N_2 = plante n°2

N_3 = plante n°3

FIG.2

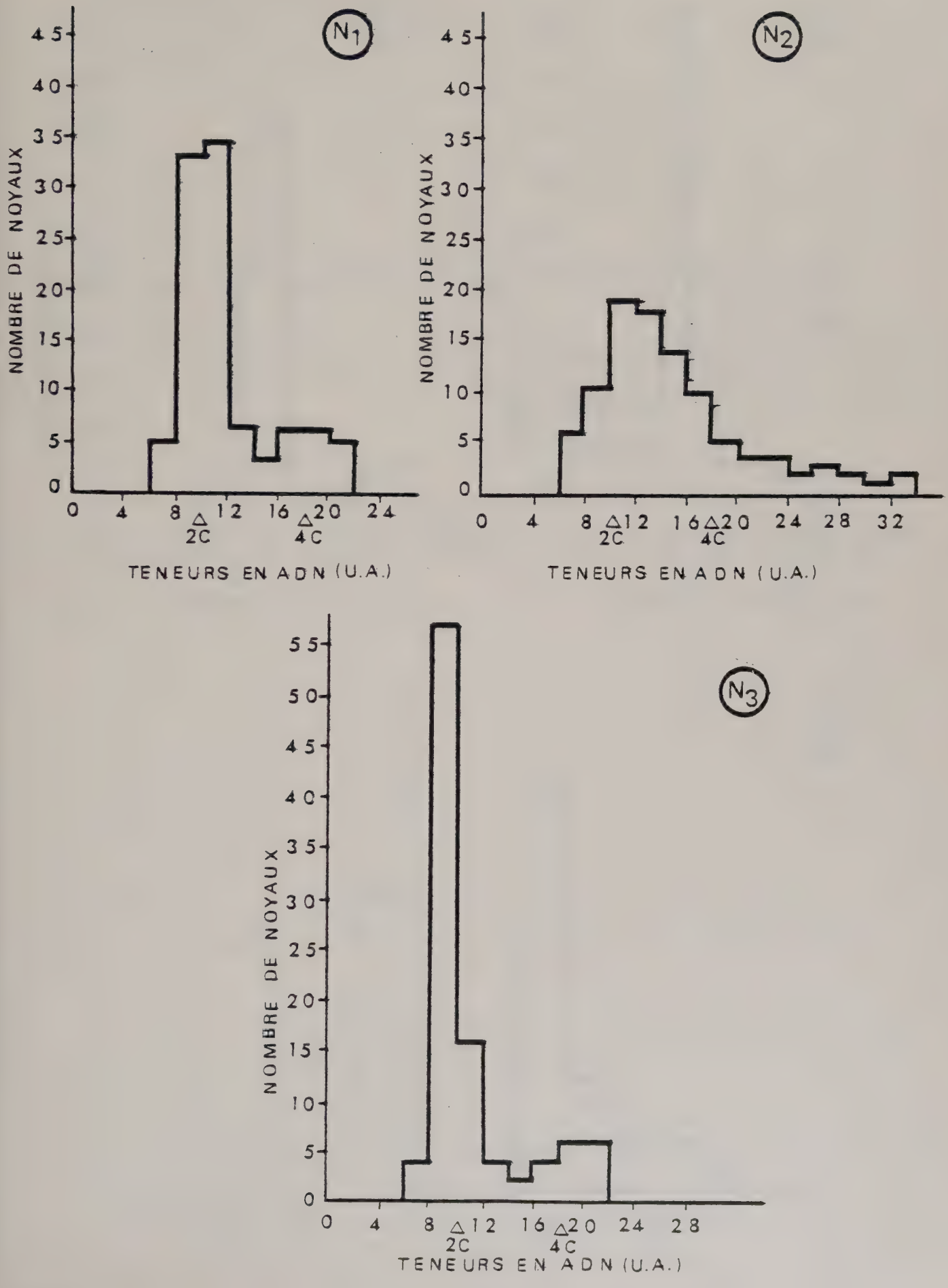

N1
NOMBRE DE NOYAUX
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
0
4
8
12
16
20
24
2C
4C
TENEURS EN ADN (U.A.)
N2
NOMBRE DE NOYAUX
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
0
4
8
12
16
20
24
28
32
2C
4C
TENEURS EN ADN (U.A.)
N3
NOMBRE DE NOYAUX
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
0
4
8
12
16
20
24
28
2C
4C
TENEURS EN ADN (U.A.)

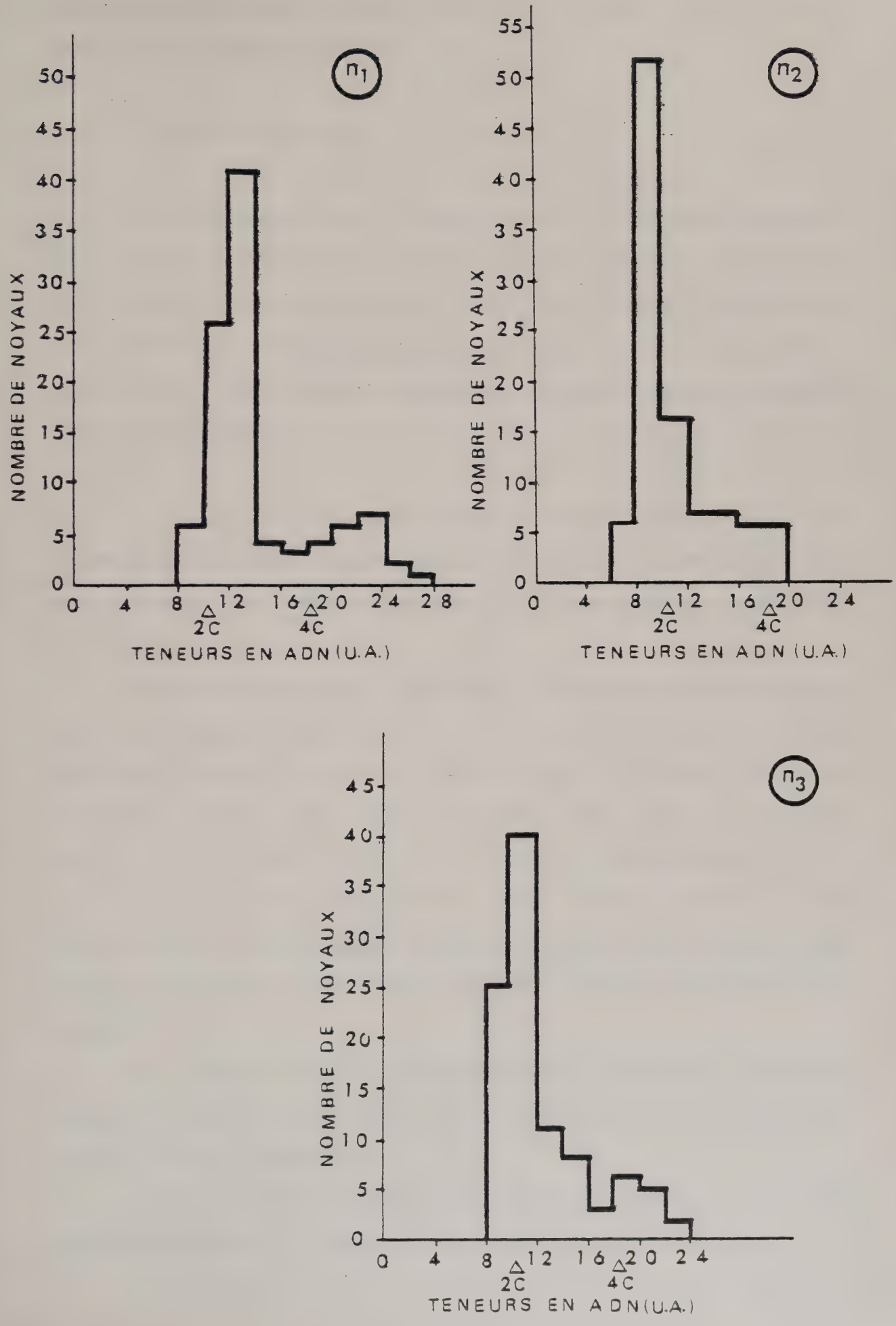
Fig.3. Teneurs en ADN mesurées chez les ovules normaux (n) de BC_2 = [2 (pbg x tab) x tab] x tab

n_1 = plante n°1

n_2 = plante n°2

n_3 = plante n°3

FIG. 3



particuliers analogues aux pétales (Photo 12). Ainsi elle peut former à elle seule une fleur très simplifiée.

- Capacité embryogène :

Par pollinisation avec le pollen de l'un ou l'autre des parents, on peut obtenir des graines fertiles à partir des ovules normaux. Pour le moment, nous n'avons pu obtenir des graines à partir des ovules nus. Par contre, les ovules nus forment des plantes haploïdes (cf. tableau 5) une fois excisés et mis en culture, tandis que les ovules normaux ne sont pas capables de produire des plantes haploïdes.

En effet, les ovules au stade "sac embryonnaire à 4 ou 8 noyaux",soit provenant des fragments d'ovaires,soit formés sur des anthères stigmatoïdes, sont mis dans les mêmes conditions de culture (milieu, température, éclairement).

Au bout de 5 à 6 semaines de culture, certains ovules nus initiés sur des anthères stigmatoïdes forment des embryons qui se développent en plantes haploïdes, alors que les ovules ovariens ne peuvent former que des organes pistilloïdes portant des ovules secondaires cités dans la littérature (HACCIUS, et al., 1974; HICKS et Mc HUGHEN, 1977; COMAMALA, 1980).

Les plantes haploïdes obtenues à partir d'ovules nus sont 2/3 plus petites que des plantes diploïdes correspondantes. Les nombres chromosomiques observés dans les cellules des pointes racinaires varient entre 24 et 25 (cf. tableau 5).

Ces plantes haploïdes conservent certains caractères des plantes diploïdes: anthères stigmatoïdes portant des ovules nus et absence de cellules -mères de tétraspores.

Chez ces plantes haploïdes, sur chaque inflorescence, seules 5 à 6 fleurs s'épanouissent et présentent des pétales laciniés (Photo 13).

α_2- Génération $BC_3 = \{[2(pbg \times tab \times tab] \times tab\} \times tab$

L'ovaire du BC_2 est fécondé par du pollen de N. tabacum. Les modifications morphologiques des plantes de BC_3 sont analogues à celles observées chez les plantes de BC_2 , sauf en ce qui concerne les cellules-mères des tétraspores absentes chez BC_3.

β- Croisement réciproque tab x [2(pbg x tab) x tab]

Nous avons réalisé le croisement réciproque consistant à prendre le N. tabacum comme parent maternel et à utiliser le pollen qu'on peut recueillir en très faible quantité de l'étamine de BC_1. Nous retrouvons une corolle de type N. tabacum, des étamines normales, des pollens fertiles et des ovules normaux.

Le parent maternel joue donc un rôle décisif dans la modification de l'appareil staminal et des grains de pollen.

Ici, nous mettons donc en évidence l'influence de l'interaction génome-cytoplasme sur la morphologie florale et la stérilité mâle.

γ - N. plumbaginifolia comme parent paternel

Afin de corroborer la conclusion précédente, nous avons réalisé les croisements suivants:

γ_1 - Génération $B'C_2$= [2(pbg x tab) x pbg] x pbg

Ce génotype a une corolle violacé pâle, étoilée comme celle de N.

plumbaginifolia (Photo 8). Les étamines sont normales avec des grains de pollen fertiles. Les ovules sont normaux.

γ_2 - Génération $B'C_3=\{[2(pbg \times tab) \times pbg] \times pbg\} \times pbg$

Ce génotype ne présente aucune modification nouvelle.

2. Générations réalisées avec N. tabacum comme parent maternel

a - Hybrides interspécifique (tab x pbg)et amphidiploïde 2(tab x pbg)

Ces hybrides ont une corolle de couleur et de forme intermédiaires par rapport à celles des parents avec des étamines normales, un ovaire et des ovules normaux et fécondables. Une seule différence existe entre les hybrides interspécifique et amphidiploïde : l'hybride interspécifique est mâle-stérile alors que l'hybride amphidiploïde est mâle-fertile.

b - Générations $B_1C_1=2\ (tab \times pbg) \times tab$ et $B'_1C'_1=2(tab \times pbg) \times pbg$

Ces génotypes conservent tous les caractères précités de l'hybride amphidiploïde .

c - Générations $B_2C_2= [2(tab \times pbg) \times tab] \times tab$ et $B'_2C'_2= [2(tab \times pbg) \times pbg] \times pbg$

Aucune modification nouvelle des étamines, pollens, ovaires et ovules n'est observée. Cependant, la forme de la corolle dépend du parent maternel (elle est pentagonale comme celle de N. tabacum), alors que la couleur de la corolle dépend du parent paternel (corolle rose foncé de N. tabacum ou violacé pâle de N. plumbaginifolia).

3. Conclusion

Parmi tous les rétrocroisements effectués, seuls ceux utilisant N. plumbaginifolia comme parent maternel peuvent induire une stérilité mâle cytoplasmique et des modifications de la morphologie florale.

II. Etude cytologique

1. Observation des chromosomes sur des pointes de racines

Les résultats groupés dans les tableaux 6 et 7 montrent que le génome d'une des deux espèces (N.plumbaginifolia ou N.tabacum) est éliminé progressivement: au niveau BC_2 [2(pbg x tab) x tab] x tab, le nombre chromosomique varie de 48 à 50 (Photo 18) dont 48 chromosomes de N.tabacum et 0 à 2 chromosomes de N.plumbaginifolia, au niveau $B'C_3$ {[2(pbg x tab) x pbg] x pbg} x pbg, les plantes ont 20 chromosomes de N.plumbaginifolia et 4 à 5 chromosomes de N. tabacum (Photo 19).

2. Méïose dans les cellules-mères des tétraspores

Tous les croisements entre N. plumbaginifolia et N. tabacum présentent des anomalies de leur méïose.

Les nombres d'univalents sont variables selon les sens et les niveaux de croisements (tableau 8). Ils sont aussi variables d'une cellule à l'autre au sein d'une même anthère. En effet, chez BC_2[2(pbg x tab) x tab] x tab, le nombre d'univalents varie entre 0 et 4 (Photo 20) et chez $B'C_3$ {[2(pbg x tab) x pbg] x pbg} x pbg , le nombre d'univalents varie entre 0 et 3 (Photo 21). Par ailleurs, plusieurs chromosomes retardataires sont observés aux niveaux de l'ana-télophase I et II.

Tableau 6. Elimination du génome N.plumbaginifolia par croisements récurrents avec N.tabacum.

Génération	Croisement réalisé	Formule zygotique		Formule gamétique		Cytoplasme
AF	pbg x pbg	PP	2n* = 20	P	n* = 10	pbg
AF	tab x tab	TT	2n' = 48	T	n' = 24	tab
F_1	pbg x tab	PT	n+n' = 34	(-)	(-)	pbg
Amphidiploïde	2(pbg x tab)	PPTT	2(n+n')= 68	PT	n+n' = 34	pbg
BC_1	2(pbg x tab) x tab	PTT	n+2n'= 58	$(P_{0\rightarrow 10})T$	$(n\rightarrow 0)+n'=24$ à 31	pbg
BC_2	[2(pbg x tab) x tab] x tab	$P_{\rightarrow 0}TT$	$(n\rightarrow 0)+2n'=48$ à 50	$P_{\rightarrow 0}T$	$(n\rightarrow 0)+n'=24$ à 28	pbg
croisement réciproque	tab x [2(pbg x tab) x tab]	$P_{\rightarrow 0}TT$	$(n\backsimeq 0)+2n'=48$	$P_{\rightarrow 0}T$	$(n\backsimeq 0)+n'=24$	tab**
BC_3	{[2(pbg xtab)xtab] xtab} xtab	P_0TT	$(n\backsimeq 0)+2n'=48$	P_0T	$(n\backsimeq 0)+n'=24$	pbg

AF = autofécondation

BC = Back cross = rétrocroisement

pbg= P = N.plumbaginifolia

tab= T = N.tabacum var.Samsun

* nombre chromosomique observé

** croisement réciproque (cytoplasme tab)

(-) stérile

Tableau 7. Elimination du génome N.tabacum par croisements récurrents avec N.plumbaginifolia.

Génération	Croisement réalisé	Formule zygotique		Formule gamétique		cytoplasme
Amphidiploïde	2(pbg x tab)	PPTT	2*(n'+n) = 68	P T	n'+n* = 34	pbg
$B'C_1$	2(pbg x tab) x pbg	P T P	n'+2n = 44	$T_{0 \rightarrow 24}P$	(n'→0)+n = 10 à 27	pbg
$B'C_2$	[2(pbg x tab) x pbg] x pbg	$T_{0 \rightarrow 24}$ P P	(n'→0) + 2n = 27	T →0 P	(n'→0)+n = 10 à 18	pbg
$B'C_3$	{[2(pbg x tab) xpbg] x pbg} x pbg	T →0 P P	(n'→0) + 2n = 24 à 25	T →0 P	(n'→0)+n = 10 à 12	pbg

B'C = Back cross = Rétrocroisement

pbg = P = N.plumbaginifolia

tab = T = N.tabacum

* = nombre chromosomique observé.

Tableau 8. Nombres d'univalents chez les croisements entre le N.plumbaginifolia et le N.tabacum *.

Nombre d'univalents	% de cellules présentant				
	2(pbg x tab) x tab	[2(pbg x tab) x tab] x tab	2(pbg x tab) x pbg[a]	[2(pbg x tab) x pbg] x pbg	{[2(pbg x tab) x pbg] x pbg} x pbg
0		3,33			66,00
1		20,33			28,00
2	3,00	58,00			5,00
3	7,00	12,67			1,00
4	34,33	5,67			0,00
5	19,33	0,00		1,00	0,00
6	23,00			11,67	0,00
7	13,33			77,00	
8	0,00			7,00	
9	0,00			3,33	
10	0,00			0,00	
11			2,00	0,00	
12			0,00	0,00	
13			7,00		
14			5,00		
15			16,00		
16			20,00		
17			50,00		
18			0,00		
19			0,00		
20			0,00		
21			0,00		
22			0,00		
23			0,00		
24			0,00		

* 300 cellules de chaque hybride sont observées.

(a) Le nombre élevé d'univalents rend le comptage difficile, le pourcentage indiqué ici n'est qu'approximatif.
Chez le BC_3 = {[2(pbg x tab) x tab] x tab} x tab , les cellules-mères des tétraspores ont avorté.

Il est important de noter que les plantes mâle-stériles avec des anthères portant des ovules nus ne sont formées qu'aux niveaux de rétrocroisements où tous ou presque tous les chromosomes de N. plumbaginifolia sont éliminés. Ce sont respectivement le cas de BC_3 ou de BC_2.

F. Conclusion

Cet ensemble de génotypes offre une grande variabilité pour tester l'aptitude à la néoformation de fleurs in vitro à partir de couches cellulaires minces.

CHAPITRE 2

FLORAISON *IN VITRO* A PARTIR DE COUCHES CELLULAIRES MINCES PRELEVEES SUR DES RAMIFICATIONS FLORALES DE DIFFERENTS GENOTYPES DE *NICOTIANA*

A. Réactions morphogénétiques comparées de couches cellulaires minces des differents génotypes de Nicotiana

I. Etude qualitative

1. Milieu de culture

Chez le *N.tabacum* var. W. 38, TRAN THANH VAN et ses collaborateurs (1974) ont montré que quatre programmes morphogénétiques (fleurs, bourgeons, racines, cals) peuvent être déclenchés sélectivement à partir d'une même assise, l'assise sous-épidermique, si l'on modifie les doses de saccharose, d'auxine et de cytokinine ajoutées au milieu de base (tableau 9). La question qui se pose est de savoir ce que vont exprimer, dans les mêmes conditions, les autres variétés, espèces et hybrides.

Les résultats groupés dans le tableau 9 montrent que toutes les variétés indifférentes au photopériodisme de *N. tabacum* ont le même comportement que celui de la variété W. 38. Par contre, la variété Maryland Mammoth est incapable de former des fleurs même si ses couches cellulaires minces sont soumises à l'eupériode. Il en est de même pour *N. sylvestris* et *N. tomentosiformis*.

Le *N. plumbaginifolia* a des potentialités proches de celles de *N. tabacum* sauf qu'il ne forme pas de fleurs sessiles mais des pousses feuillées

Tableau 9. Influence de substances de croissance sur la formation de fleurs *in vitro* chez différents génotypes de *Nicotiana*.

Génotypes	Programmes morphogénétiques en présence de			
	1	2	3	4
	AIA 10^{-6}M Kin 10^{-6}M	AIA 10^{-6}M Ba 10^{-5}M	AIB 10^{-5}M Kin 10^{-7}M	2-4 D 5.10^{-6}M Kin 10^{-7}M
N.tabacum var. W.38	F	B	R	C
Samsun	F	B	R	C
Xanthi	F	B	R	C
Lacerata	F	B	R	C
Maryland Mammoth	B	B	C	C
N.plumbaginifolia	F	B	R	C
N.sylvestris	B	B	R	C
N.tomentosiformis	B	B	R	C
N.sylvestris x *N.tomentosiformis*	F	B	R	C
2(*N.sylvestris* x *N.tomentosiformis*)	F	B	R	C
N.sylvestris x *N.tabacum*	F	B	R	C
N.tabacum x *N.sylvestris*	F	B	R	C
N.tabacum x *N.tomentosiformis*	F	B	R	C

- 1, 2, 3, 4, appelés respectivement milieux "fleur", "bourgeon", "racine", "cal"
- F = fleur, B = bourgeon, R = racine, C = cal
- Nombre d'explants par expérience : 24
- Nombre de répétitions : 3

florales (comportant 3 à 4 entre-noeuds séparés par des petites feuilles, Photo 22).

Tous les hybrides N. sylvestris x N. tomentosiformis, N. sylvestris x N. tabacum, N. tabacum x N. tomentosiformis ont des potentialités analogues à celles de la variété W. 38. Sur ces génotypes, nous obtenons uniquement des fleurs "sessiles" (Photo 23),c'est-à-dire que leur pédoncule est directement inséré sur l'explant, sans formation d'une tige feuillée (ou pourvue de bractées) si courte soit-elle.

Le milieu "fleur"(tableau 9) a donc été choisi pour la suite de nos expériences.

2. Etat physiologique de la plante-mère

Il a été montré (TRAN THANH VAN et al., 1974) que le stade physiologique de la plante-mère est un facteur important pour l'obtention de fleurs in vitro chez le N. tabacum var. W. 38. Ces résultats s'appliquent à l'ensemble des génotypes étudiés. En effet, chez les génotypes les plus favorables à la formation de fleurs (variétés Samsun, Xanthi) il a été observé que, de tous les stades étudiés du développement de la fleur terminale de l'inflorescence (bouton, fleur épanouie, fleur fanée et fruit vert) seul le stade "fruit vert" permet l'obtention de fleurs chez 100% d'explants. Pour les autres stades, un mélange de fleurs et de bourgeons est obtenu. Cependant, chez les hybrides mâle-stériles, le stade le plus favorable pour la formation est le stade "fleur fanée" correspondant au stade "fruit vert" chez les plantes fertiles.

Le stade "fruit vert" est donc choisi pour la suite de nos expériences.

II. Etude quantitative

1. Résultats obtenus avec N. tabacum, ses espèces parentales et leurs hybrides, et N. plumbaginifolia.

Les résultats (tableau 10) montrent que sur un milieu de composition donnée (milieu "fleur") nous obtenons 3 types de réponse:

- chez des plantes à exigences photopériodiques telles que N. tabacum var. M.Mammoth,, N. sylvestris et N. tomentosiformis, 100% d'explants forment des bourgeons végétatifs quelles que soient les photopériodes appliquées.

- Chez le N. plumbaginifolia , 100% d'explants forment des pousses feuillées florales .

- Enfin, nous obtenons des fleurs sessiles dans 100% des cas avec 3 variétés de N. tabacum et l'hybride N. sylvestris x N. tabacum, tandis que chez l'hybride réciproque N. tabacum x N. sylvestris, seulement 60% d'explants forment des fleurs avec quelques bourgeons végétatifs. La présence du génome paternel de N. tabacum semble donc essentielle pour la production de 100% de fleurs sessiles. L'hybride N. sylvestris x N. tomentosiformis bien qu'il ait un besoin absolu de jours longs est capable de former in vitro des fleurs sessiles chez 30% d'explants tout comme des plantes indifférentes. Dans ce cas, on peut penser que c'est l'interaction entre ces deux génotypes qui a permis la néoformation in vitro de fleurs.

2. Croisements entre N. plumbaginifolia et N. tabacum

Les résultats (tableau 11) montrent que:

- les deux parents forment, in vitro, dans 100% des cas, l'un, des fleurs sessiles, l'autre, des pousses feuillées florales.

Tableau 10. Comparaison de la potentialité de néoformation florale de différents génotypes de Nicotiana sur le milieu "fleur".

Génotypes	% d'explants formant des		
	fleurs sessiles	pousses feuillées florales	bourgeons
N.tabacum var. W.38	100	0	0
Samsun	100	0	0
Xanthi	100	0	0
Lacerata	82	0	18
Maryland Mammoth	0	0	100
N.plumbaginifolia	0	100	0
N.sylvestris	0	0	100
N.tomentosiformis	0	0	100
N.sylvestris x N.tomentosiformis	30	0	70
2(N.sylvestris x N.tomentosiformis)	30	0	70
N.sylvestris x N.tabacum	100	0	0
N.tabacum x N.sylvestris	60**	0	40
N.tabacum x N.tomentosiformis	75**	0	25

- Plantes-mères au stade "fruit vert" (pour les génotypes fertiles) ou "fleur fanée" (pour les génotypes stériles)

-*Les pourcentages de néoformation figurés sur ce tableau sont des valeurs moyennes.

-**Explants formant à la fois des fleurs sessiles et quelques bourgeons végétatifs.

- Chaque expérience comporte 24 explants est répétée au moins 2 fois

Tableau 11. Type des fleurs néoformées *in vitro* chez *N.plumbaginifolia*, *N.tabacum* et leurs croisements.

Génération	Croisement réalisé	Cyt	% d'explants formant des		
			fleurs directes	pousses feuillées florales	bourgeons végétatifs
AF	pbg x pbg	pbg	0	100	0
AF	tab x tab	tab*	100	0	0
F_1	pbg x tab	pbg	0	72,22 ± 4,80	27,77 ± 4,80
Amphidiploïde	2(pbg x tab)	pbg	0	79,16 ± 7,21	20,83 ± 7,21
BC_1	2(pbg x tab) x tab	pbg	100(a)	0	0
BC_2	[2(pbg x tab) x tab] x tab	pbg	100	0	0
Croisement réciproque	tab x [2(pbg x tab) x tab]	tab*	100	0	0
BC_3	{[2(pbg x tab) x tab] x tab} x tab	pbg	100	0	0
$B'C_1$	2(pbg x tab) x pbg**	pbg	0	100	0
$B'C_2$	[2(pbg x tab) x pbg] x pbg**	pbg	0	100	0
$B'C_3$	{[2(pbg x tab) x pbg] x pbg} x pbg**	pbg	0	100	0
F'_1	tab x pbg**	tab*	76,38 ± 6,36	0	23,61 ± 6,35
Amphidiploïde	2(tab x pbg**)	tab*	77,77 ± 4,80	0	22,22 ± 4,80
B_1C_1	2(tab x pbg) x tab	tab*	100	0	0
B_2C_2	[2(tab x pbg) x tab] x tab	tab*	100	0	0
$B'_1C'_1$	2(tab x pbg) x pbg**	tab*	0	100	0
$B'_2C'_2$	[2(tab x pbg) x pbg] x pbg**	tab*	0	100	0

(a) 100% d'explants formant à la fois des fleurs directes et quelques bourgeons végétatifs.

Cyt = cytoplasme

* cytoplasme *N.tabacum*

** génome *N.plumbaginifolia*

Nombre d'explants par expérience : 24

- leurs hybrides issus de N. plumbaginifolia (parent maternel) et N. tabacum (parent paternel), qu'ils soient amphidiploïdes 2(pbg x tab) ou non (pbg x tab) forment des bourgeons végétatifs chez 25% des explants environ et des pousses feuillées florales chez les 75% restant.

- Les plantes des générations BC_1, BC_2 et BC_3 se comportent comme N. tabacum ,100% des explants formant des fleurs sessiles.

- Nous remarquons aussi que chez le croisement réciproque tab x [2(pbg x tab) x tab] , 100% des explants forment des fleurs sessiles (Photo 24).

- Réciproquement, si les hybrides interspécifiques ont le N. tabacum comme parent maternel et le N. plumbaginifolia comme parent paternel (tab x pbg) ou 2(tab x pbg), nous obtenons les mêmes pourcentages d'explants formant des bourgeons végétatifs (25%) et des fleurs sessiles (75%) que le nombre chromosomique soit doublé ou non (TP ou TTPP).

- lorsque les génotypes ont N.tabacum comme parent paternel (B_1C_1) et B_2C_2) , ils forment des fleurs sessiles dans 100% des cas.

- lorsque les génotypes ont N.plumbaginifolia comme parent paternel ($B'_1C'_1$ et $B'_2C'_2$) , ils forment des pousses feuillées florales (Photo 25) dans 100% des cas.

En conclusion, chez les hybrides interspécifiques à nombres chromosomiques doublés ou non pour lesquels la proportion génome/génome des deux espèces parentales est égale à 1, le type de fleurs néoformées (sessiles ou pousses feuillées florales) est déterminé par le parent maternel.Chez toutes les générations issues des rétrocroisements pour lesquelles les doses génomiques de l'une des deux espèces parentales deviennent dominantes (1P pour 2T ou 3T, ou 1T pour 2P ou 3P), c'est la nature du pollen (parent mâle) qui détermine le type de fleurs néoformées.

Il faut aussi signaler que les fleurs sessiles formées in vitro chez les hybrides des 2e et 3e rétrocroisements sont analogues à celles formées sur la plante-mère: elles ont des anthères stigmatoïdes portant des ovules nus.

III. Conclusion

L'utilisation d'un grand nombre d'espèces et de leurs hybrides a permis de préciser le mode de transmission héréditaire de l'aptitude à la floraison in vitro. Cette aptitude apparaît comme dépendante à la fois d'un contrôle chromosomique et d'un contrôle cytoplasmique. La capacité à différencier de novo des fleurs révélée chez des explants de l'hybride de jours longs (N.sylvestris x N.tomentosiformis) ne concorde pas avec l'hypothèse de PREVOT (1939) sur Begonia: "si aucun des deux parents n'a la faculté de bourgeonner, l'hybride qui en résulte ne la possède pas non plus".

B. Influence du niveau de ploïdie sur la formation de fleurs in vitro

I. Notion d'hypohaploïdie (schéma 1)

Lorsque nous cultivons in vitro du pollen prélevé sur des plantes-mères diploïdes (D) nous régénérons des plantes haploïdes (Ha). Ces plantes sont toujours stériles et les grains de pollen, non viables, ne sont plus capables de former des embryons lorsqu'on met les anthères en culture in vitro. Cette limite était jusqu'à ce jour infranchissable (NIIZEKI et KITA, 1975).

Si nous prélevons des couches cellulaires minces sur une plante-mère fleurie diploïde, nous obtenons des fleurs in vitro avec des anthères qui sont le siège de méïoses normales et qui produisent des grains de pollen. Ces grains de pollen , une fois mis en culture, régénèrent des plantes haploïdes (He). Les plantes haploïdes sont toujours stériles. Mais si nous prélevons

Schéma 1

Diverses voies d'obtention des embryons à partir d'anthères formées *in vivo* et *in vitro*.

D : plante-mère diploïde

ep : épiderme

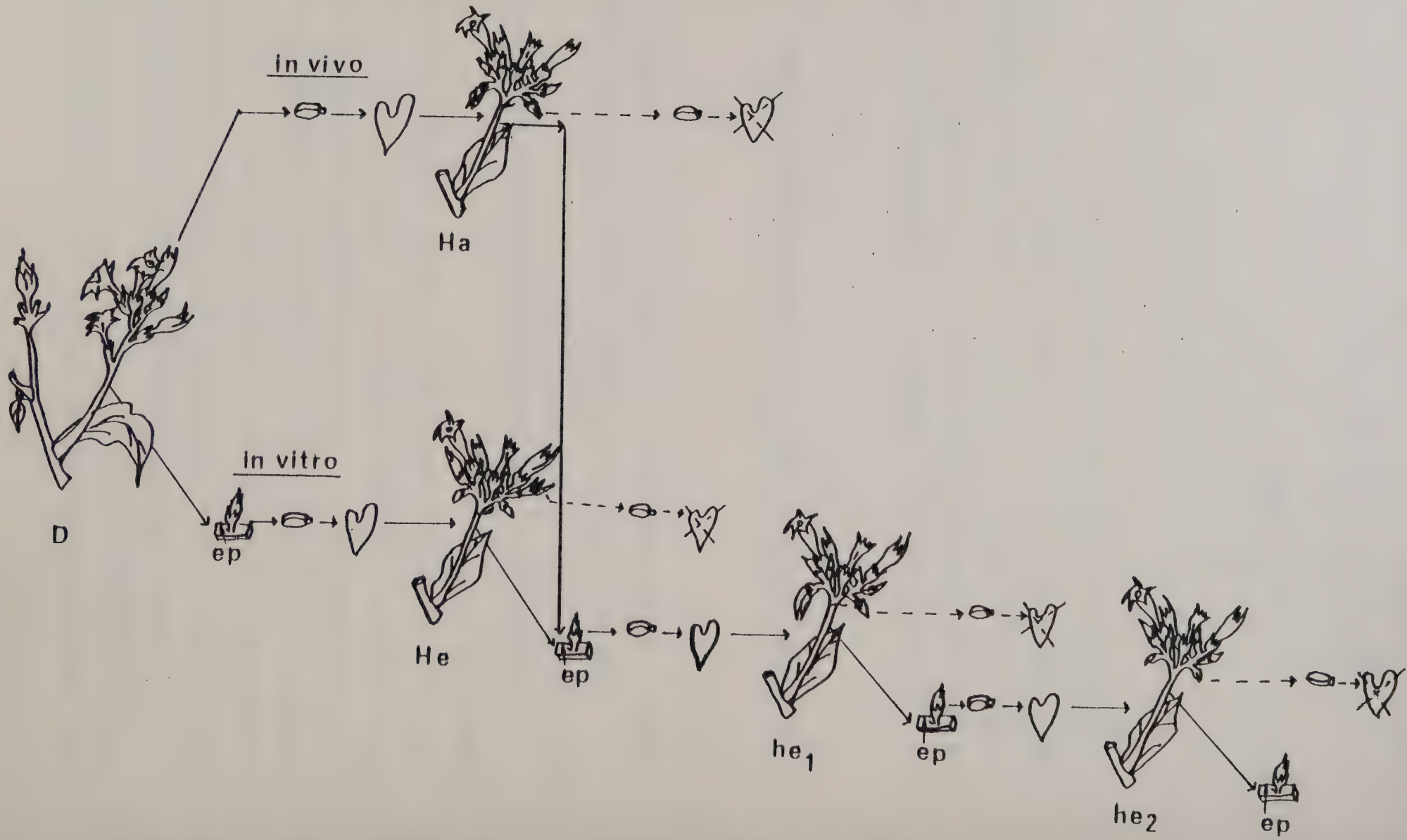
Ha : plante haploïde obtenue à partir d'anthères de la plante-mère diploïde

He : plante haploïde obtenue à partir d'anthères *in vitro* provenant de couches cellulaires minces diploïdes

he_1 : plante "hypohaploïde" de 1ère génération obtenue à partir d'anthères *in vitro* de He

he_2 : plante "hypohaploïde" de 2ème génération obtenue à partir d'anthères *in vitro* de he_1 .

SCHEMA 1



des couches cellulaires minces sur ces plantes haploïdes, celles-ci produisent in vitro des fleurs.

Ce qui est inattendu et nouveau, c'est que les grains de pollen de ces fleurs in vitro produisent des embryons qui se développent en plantes dites "hypohaploïdes" parce que leurs cellules ont perdu un ou plusieurs chromosomes par rapport aux plantes haploïdes. Sur ces plantes hypohaploïdes de première génération (he_1) nous pouvons prélever des couches cellulaires minces qui forment in vitro des fleurs. Or le pollen de ces fleurs produit à nouveau des embryons qui se développent en plantes hypohaploïdes de deuxième génération (he_2).

Le phénomène d'hypohaploïdie nécessite une étude détaillée qui sera faite dans la deuxième partie de ce mémoire.

Dans ce qui suit, nous analysons seulement, à différents niveaux de ploïdie, l'aptitude des couches cellulaires minces à la régénération des fleurs.

II. Niveau de ploïdie et aptitude à la formation de fleurs in vitro

Disposant chez le N. tabacum et le N. plumbaginifolia des plantes diploïdes, haploïdes et hypohaploïdes par culture successive d'anthères formées in vitro (schéma 1), nous avons testé leurs aptitudes respectives à former des fleurs in vitro et ceci en fonction de deux conditions d'environnement : la photopériode et la température.

1. Influence de l'éclairement

a. N. tabacum

A 24°C, sous les photopériodes 9h, 12h, 16h, 24h la formation de fleurs est observée plus tôt chez les explants hypohaploïdes et haploïdes que

chez les explants diploïdes. En effet, 100% des explants forment des fleurs au bout de 17, 21 et 23 jours après la mise en culture respectivement pour les explants hypohaploïdes, haploïdes et diploïdes (fig.4).

Par contre, à l'obscurité nous observons que

- un certain pourcentage d'explants forment des bourgeons
- les fleurs formées sont portées par une tige feuillée plus ou moins courte.
- Il n'y a donc pas l'expression d'une morphogenèse d'emblée florale.

Les pourcentages obtenus sont respectivement de 45% et 80% chez les explants diploïdes et hapohaploïdes ou hypohaploïdes.

Une autre différence a été observée: le nombre de fleurs formées par explants est plus élevé chez les hypohaploïdes et haploïdes (50 fleurs en moyenne par explant) que chez les diploïdes(30 fleurs).

b. N. plumbaginifolia

Chez cette espèce la néoformation de fleurs in vitro est aussi observée dans un délai plus court chez les explants hypohaploïdes que chez les explants haploïdes et diploïdes.

A 24°C, pour les photopériodes de 12h, 16h, 24h, 100% d'explants hypohaploïdes, haploïdes et diploïdes forment des fleurs respectivement au bout de 20, 27 et 30 jours de culture.

Sous 9h d'éclairement, le pourcentage d'explants formant des fleurs diminue : 80% chez les explants hypohaploïdes ou haploïdes, 60% chez les explants diploïdes. La formation de fleurs chez N. plumbaginifolia est donc dépendante de la durée de l'éclairement.

A l'obscurité, aucun explant ne forme de fleurs.

Par ailleurs , le nombre de feuilles formées avant la fleur est plus faible (2 à 3 feuilles) chez les explants hypohaploïdes et haploïdes que chez

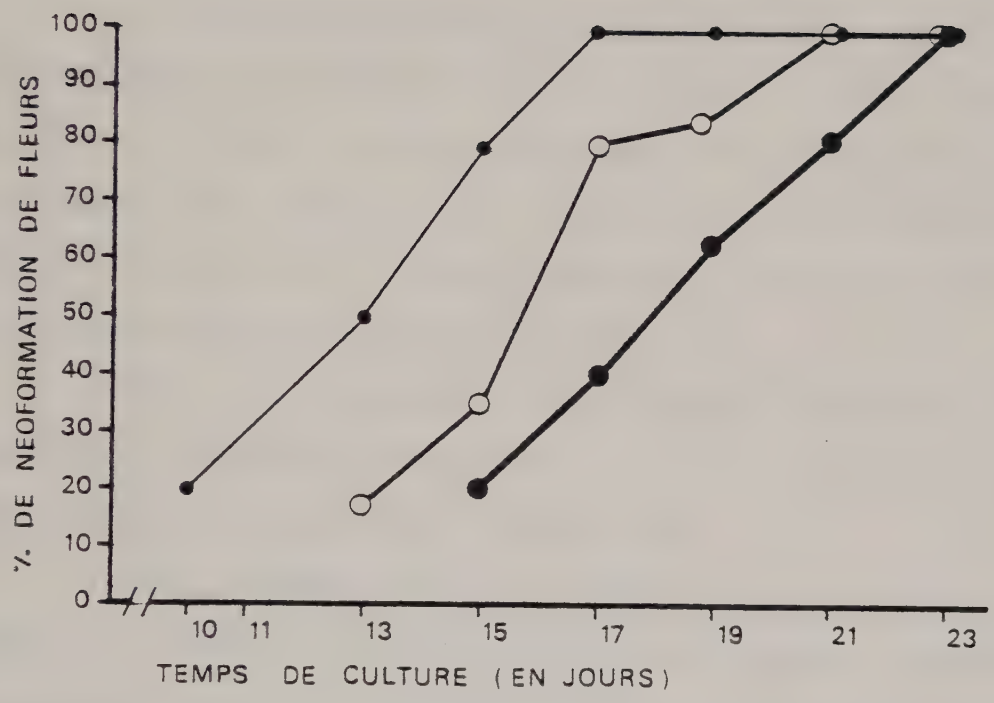


Fig.4. Délai de la néoformation florale à partir d'explants diploïde ●—●, haploïde ○—○ et hypohaploïde ●——● chez N. tabacum.

Expériences réalisées à 24°C en lumière continue.

- Nombre d'explants par expérience : 24
- Nombre de répétitions : 3

les explants diploïdes (4 à 5 feuilles).

2. Influence de la température

Nos expériences ont été effectuées à 17°, 22°, 24° et 27°C sous 24h d'éclairement.

a. N. tabacum

Les résultats groupés dans le tableau 12 montrent qu'à 27°C, 100% des explants forment des fleurs quel que soit le niveau de ploïdie. Seuls varient les délais: 20, 19, 14 jours respectivement chez les explants diploïdes, haploïdes et hypohaploïdes. A cette température, un même explant forme à la fois des fleurs et des bourgeons végétatifs. On ne peut plus séparer l'expression des deux programmes morphogénétiques.

A 24°C, tous les explants forment uniquement des fleurs. Le délai de néoformation florale est respectivement de 23, 21 et 17 jours chez les explants diploïdes, haploïdes et hypohaploïdes.

A 22°C, les délais sont plus longs: 28, 21 et 21 jours. Ici, les pourcentages d'explants formant des fleurs sont seulement de 60% pour les deux premiers cas et de 75% pour le troisième. Le reste des explants forme des bourgeons.

Les expressions des deux programmes morphogénétiques so nt à nouveau mêlées.

A 17°C, les pourcentages d'explants formant des fleurs sont nettement réduits à tous les niveaux de ploïdie (8%, 12% et 12%) et le délai nécessaire est plus long (30, 30 et 28 jours). Le reste des explants dans ce cas forme un cal très réduit.

Tableau 12. Influence de la température sur la néoformation de fleurs à partir de couches cellulaires minces diploïde, haploïde et hypohaploïde de N.tabacum.

Température °C	Délai et pourcentage de néoformation florale à partir d'explants					
	Diploïde		Haploïde		Hypohaploïde	
	Délai en jours	* % explants formant des fleurs	Délai en jours	% explants formant des fleurs	Délai en jours	% explants formant des fleurs
27	20 +	100	19	100	14	100
24	23	100	21	100	17	100
22	28	60	21	66	21	75
17	30	8	30	12	28	12

- Expériences réalisées en lumière continue
- Nombre d'explants par expérience : 48
- Nombre de répétitions : 2

* Les pourcentages exprimés n'augmentent pas au delà du délai indiqué.

+ Les premières ébauches florales apparaissent dès le 14ème jour.

b. N. plumbaginifolia (tableau 13)

Chez cette espèce, la température optimale de néoformation de pousses feuillées florales est 24°C, quel que soit le niveau de ploïdie. Les délais étant alors de 30, 27 et 20 jours, respectivement chez les explants diploïdes, haploïdes et hypohaploïdes. A 27°C, les pourcentages d'explants formant des fleurs diminuent nettement (de 100% à 4%). Il en est de même,à 22°C et 17°C.

Pour toutes les températures testées les pourcentages d'explants formant des pousses feuillées florales chez les explants hypohaploïdes sont toujours plus élevés que ceux des explants haploïdes et diploïdes.

C. Conclusion

Il existe des conditions thermiques optimales pour induire la formation de fleurs in vitro: un écart de 2°C seulement (de 24°C à 22°C) ramène le pourcentage d'explants diploïdes formant des fleurs de 100% à 60% (N. tabacum) ou à 30% (N.plumbaginifolia).

Quant à l'éclairement, il est nécessaire pour que les fleurs soient sessiles sur la surface de l'explant.

Enfin, dans des mêmes conditions de culture, il semble que plus le degré de ploïdie est bas, plus la capacité à différencier des fleurs est rapide et facile à révéler.

Tableau 13 . Influence de la température sur la néoformation de fleurs à partir de couches cellulaires minces diploïde, haploïde et hypohaploïde de N.plumbaginifolia.

Température °C	Délai et pourcentage de néoformation florale à partir d'explants					
	Diploïde		Haploïde		Hypohaploïde	
	Délai en jours	* % explants formant des fleurs	Délai en jours	% explants formant des fleurs	Délai en jours	% explants formant des fleurs
27	26	4	24	20	20	45
24	30	100	27	100	20	100
22	35	30	32	45	32	45
17	45	4	45	8	45	8

Expériences réalisées en lumière continue

- Nombre d'explants par expérience : 48
- Nombre de répétitions : 2

* Les pourcentages exprimés n'augmentent pas au delà du délai indiqué.

DEUXIEME PARTIE

ORIGINALITE DE L'ANDROGENESE OBTENUE A PARTIR DES ANTHERES FORMEES IN VITRO

Nous avons montré qu'un explant de dimensions réduites, prélevé convenablement, donne naissance en 14 jours à un grand nombre de fleurs. Sur la plante-mère , au contraire, il faut attendre la fin du cycle de végétation, soit 3 à 4 mois de culture. Ces deux types de fleurs sont apparemment identiques et normaux. On se demande si les capacités d'androgenèse de ces deux types de fleurs sont les mêmes ou si la cinétique rapide et l'environnement très particulier qui caractérisent la culture in vitro n'introduisent pas des modifications de la qualité du pollen et de son aptitude embryogène. Nous avons donc étudié cette capacité d'androgenèse et les caractères des plantes issues de pollen formés soit in vitro, soit in vivo sur des plantes mères. Pour cela, nous avons choisi deux matériels: N. tabacum et N. plumbaginifolia.

A. N. tabacum variété Samsun

Chez cette variété nous avons étudié successivement :

- la cytologie des figures de méïoses des cellules-mères des tétraspores formées in vivo et in vitro.
- la capacité embryogène des grains de pollen contenus dans les anthères formés in vivo et in vitro.
- la morphologie des plantes issues des anthères mises en culture.

I. Plantes diploïdes (2n = 2X + 2X' = 48)

1. Cytologie des figures de méïose

Chaque stade d'évolution du pollen peut être repéré grâce aux dimensions des fleurs (tableau 14).

Chez les fleurs formées in vitro, les dimensions des fleurs et celles de leurs anthères, pour un même stade d'évolution, sont en général de 2/3 plus petites que celles obtenues in vivo sur la plante-mère. Autrement dit, un bouton de même taille renfermera des grains de pollen à des états d'évolution différents dans les deux cas (par exemple, pour une taille de la fleur de 0,8 cm, il n'y a que des tétrades in vivo alors qu'on observe du pollen uninucléé in vitro).

Lorsque, à un stade quelconque de la méïose (métaphase I, tétrade, voir tableau 15), on détermine le pourcentage maximum de figures correspondant à ce stade, on trouve que ce pourcentage est plus proche de 100% chez les anthères formées in vivo que chez les anthères formées in vitro. Autrement dit à la fin de la méïose, tous les grains de pollen du témoin (in vivo) sont rigoureusement au même stade alors que sur la couche cellulaire mince demeure plus longtemps une hétérogénéité assez forte. Cette hétérogénéité peut résulter d'une désynchronisation mais aussi d'une vitesse plus grande d'évolution des stades de la méïose in vivo. Cette hétérogénéité existe jusqu'à ce que tous les pollens deviennent binucléés. Par conséquent, lors de la mise en culture, les anthères formées in vitro présentent toujours un mélange de stades mitotiques donc une variation de la capacité embryogène qui n'existe pas in vivo.

2. Capacité embryogène des grains de pollen

Rappelons que chez le Nicotiana, au cours de la formation in vitro de

Tableau 14. Relation entre la taille des boutons floraux et le stade d'évolution des grains de pollen chez le N. tabacum.

Taille des boutons floraux (en cm)	Stade des grains de pollen	
	in vivo	in vitro
0,6	1ère division	tétrade
0,8	tétrade	uninucléé
1,00 - 1,20	uninucléé	binucléé (début)
1,20 - 1,40	binucléé (début)	binucléé
1,40 - 1,60	binucléé	binucléé (fin)
1,60 - 1,80	binucléé (fin)	grains de pollen à maturité

- Expériences réalisées à 27°C en 16h d'éclairement sur le milieu "fleur"
- Nombre d'anthères par stade et par expérience: 200
- Nombre de répétitions : 4

Tableau 15. Degré comparé du synchronisme de la méïose *in vivo* et *in vitro*.

Stade de la méïose	% de cellules observées chez les anthères	
	in vivo	*in vitro*
Métaphase I	0,12	1,86
Ana-télophase I	0,10	0,23
Métaphase II	0,25	3,48
Ana-télophase II	0,63	8,51
Tétrade	98,90	85,91
Nombre de cellules observées	4900	1292

l'embryon à partir de grains de pollen, c'est la cellule végétative qui entre en division (VAZART, 1973; DUNWELL et SUNDERLAND, 1975).

On sait aussi que le pourcentage d'anthères formant des embryons dépend de plusieurs facteurs: le stade d'évolution des grains de pollen, le milieu de culture, la température et la lumière.

a. Influence du stade d'évolution des grains de pollen

Dans nos conditions expérimentales (27°C et 16h d'éclairement), le stade le plus favorable (tableau 14) pour la formation d'embryons est le début du stade binucléé (photo 26), que les anthères soient formées in vivo ou in vitro. De plus, pour un même stade d'évolution binucléé par exemple du pollen, les pourcentages obtenus avec des anthères formées in vitro (70%) sont toujours plus élevés que ceux obtenus avec des anthères in vivo (50%). On remarque également, aux stades plus précoces (tétrade et première division des cellules-mères des tétraspores), que ce pourcentage est nul quel que soit l'origine des anthères (Fig.5).

b. Influence du milieu de culture

Les anthères formées in vivo et in vitro sont placés sur 5 types de milieu.

- Milieu de base(MB)
- Milieu "cal", "racine", "bourgeon" et "fleur" (tableau 3, voir Matériels et Méthodes).

Sur les milieux "cal" et "racine", les anthères forment uniquement des cals, tandis que sur le milieu "bourgeon" les anthères forment d'abord des cals et, à partir de ces cals, des bourgeons (photo 27). Seuls les milieux

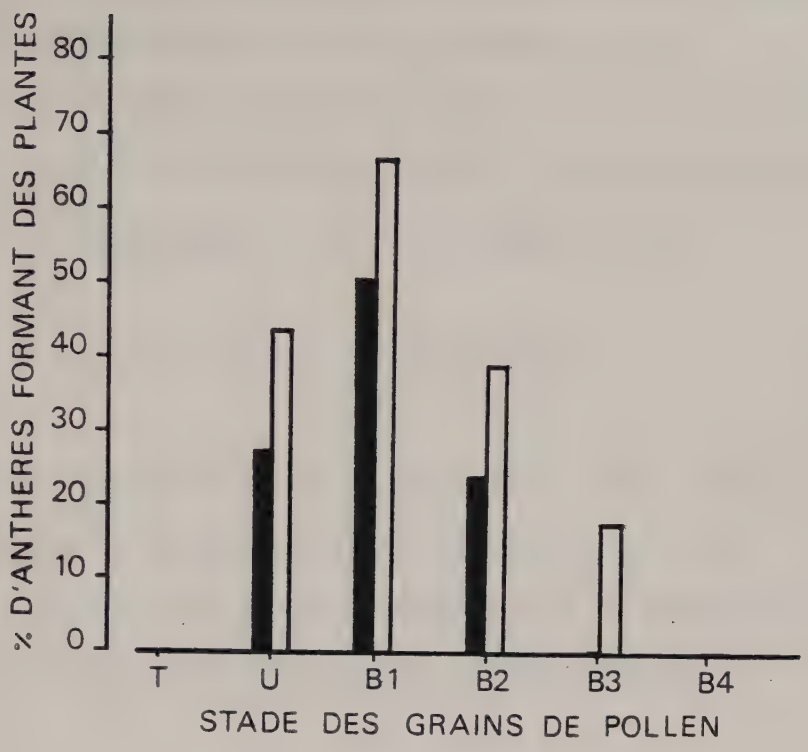


Fig.5. Pourcentages d'anthères (in vivo et in vitro) formant des plantes aux différents stades des grains de pollen chez le N. tabacum

T Tétrade

U uninucléé

B_1 binucléé (début)

B_2 binucléé

B_3 binucléé (fin)

B_4 grains de pollen à maturité

■ in vivo

□ in vitro

- Expériences réalisées à 27°C en 16h d'éclairement sur le milieu "fleur"
- Nombre d'anthères par stade et par expérience: 200
- Nombre de répétitions : 4

"fleur" et MB permettent l'obtention des embryons (photo 28) qui se développent directement en plantes haploïdes (photo 29).

Les pourcentages d'anthères formant des plantes haploïdes sont les mêmes sur les deux types de milieu ("fleur" et MB). On obtient dans les deux cas 70% de succès in vitro contre 50% in vivo (Fig.5).

c. Influence de la température

Parmi les températures testées 17°C, 22°C, 24°C et 27°C (en 16h d'éclairement), la température la plus favorable est 27°C.

A 17°C, les pourcentages respectifs de la formation d'embryons sont 0% et 2% pour les anthères in vivo et in vitro (Fig.6).

d. Influence de la lumière

Les expériences ont été effectuées à 27°C en 9h, 16h et 24h d'éclairement ou à l'obscurité. Le pourcentage d'embryons obtenus reste inchangé quelles que soient les conditions.

En conclusion, toutes conditions égales par ailleurs, les pourcentages d'androgenèse obtenus chez les anthères formées in vitro sont toujours plus élevés que ceux obtenus chez les anthères développées in vivo sur la plante-mère.

II. Plantes haploïdes (n = X + X' = 24)

1. Aspects morphologiques et cytologiques des plantes haploïdes

Les plantes haploïdes obtenues à partir d'anthères in vivo (Ha) et in vitro (He, schéma 1), une fois rempotées en serre, fleurissent abondamment,

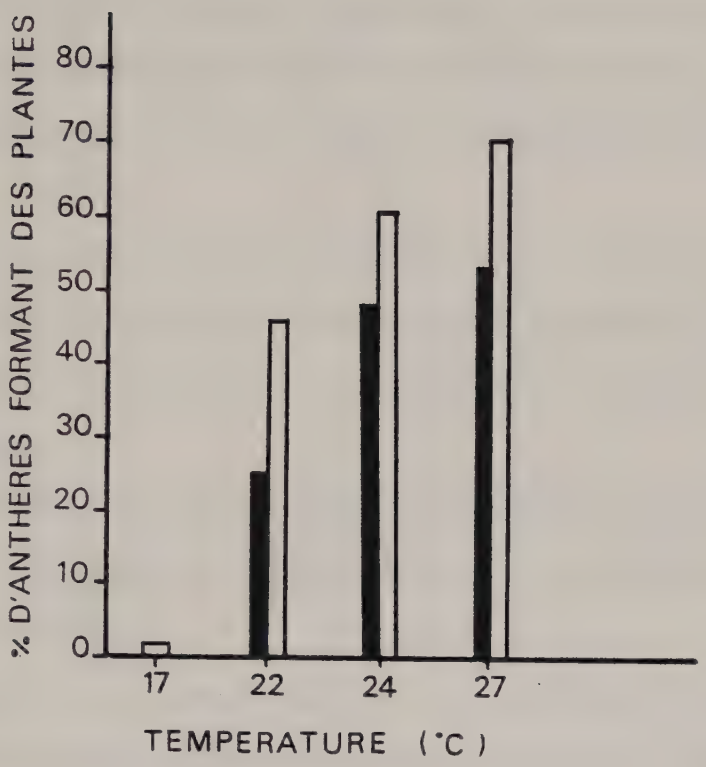


Fig.6. Influence de la température sur la production des plantes haploïdes chez le N. tabacum.

■ in vivo

□ in vitro

- Expériences réalisées en 16h d'éclairement sur le milieu "fleur"
- Grains de pollen au stade binucléé
- Nombre d'anthères par température et par expérience: 200
- Nombre de répétitions: 2

mais les fleurs sont stériles. Elles renferment cependant des anthères sur lesquelles la méïose peut être étudiée. Un petit nombre de grains de pollen est en effet formé dont nous verrons qu'il n'est pas viable.

Les plantes haploïdes (Ha et He) sont de 2/3 plus petites que les plantes diploïdes. Aucune différence n'est décelable entre les deux haploïdes Ha et He.

Les comptages de chromosomes (photo 30) effectués sur les pointes racinaires des plantules obtenues à partir d'anthères in vivo ont montré que sur 24 plantules, on trouve 14 haploïdes, 2 diploïdes, 2 mixoploïdes et 6 aneuploïdes.

Par contre, sur 24 plantules obtenues à partir d'anthères in vitro, on trouve 16 haploïdes, 2 mixoploïdes et 6 aneuploïdes. Il n'y a pas eu de plantules diploïdes.

Sur les plantes haploïdes obtenues (Ha et He) nous prélevons à nouveau des couches cellulaires minces. Celles-ci peuvent à nouveau former des fleurs.

L'étude des figures de méïose des deux types d'anthères obtenues in vivo (plantes Ha et He) et in vitro (couches cellulaires minces Ha et He) montre des différences importantes au point de vue de l'association chromosomique à la méta-anaphase I. Les résultats sont groupés au tableau 16. La valeur de X^2 indique que la fréquence des appariements chromosomiques (photo 31) est significativement plus élevée pour les méïoses in vitro que pour les méïoses in vivo. Les appariements chromosomiques plus fréquents pour la méïose in vitro pourraient conduire à l'obtention de plantes hypohaploïdes (cf. p.67).

2. Capacité embryogène des grains de pollen

Les anthères haploïdes formées in vivo et in vitro sont mises en culture dans les mêmes conditions (grains de pollen au stade binucléé, milieu

Tableau 16. Nombre de cellules-mères de tétraspores formées *in vivo* et *in vitro* avec ou sans association (monovalent) entre chromosomes homologues chez les plantes haploïdes de *N. tabacum*.

	Pseudo-multivalents	Bivalents	Monovalents	Nombre de cellules observées
Méïose *in vivo*	4	12	369	385
Méïose *in vitro*	13	48	224	285

$X^2_{observé}$ =47.97 degré de liberté = 2

$X^2_{0.05}$ =5.99

"fleur", 27°C). Aucune anthère *in vivo* ne donne d'embryon, tandis que les grains de pollen de 10% des anthères formées *in vitro* produisent des embryons, puis des plantes dont le nombre de chromosomes varie entre 2 et 24. Ces plantes qui ont perdu un ou plusieurs chromosomes par rapport aux plantes haploïdes sont nommées "plantes hypohaploïdes" de 1ère génération (he_1-schéma 1).

III. Plantes hypohaploïdes ($n = X + X' < 24$)

1. Aspects morphologiques des plantes hypohaploïdes (de 1ère génération)

L'inflorescence des plantes hypohaploïdes est composée de fleurs dont la taille est de 1/3 plus petite que celle des fleurs des plantes haploïdes. De plus, sur la même plante, toutes les fleurs ne sont pas identiques entre elles. Certaines fleurs présentent la forme caractéristique des fleurs de *N. tabacum* haploïde, d'autres ont des pétales blancs de forme pointue qui rappellent ceux du *N. sylvestris* (une des deux espèces parentales de *N. tabacum*).

De plus, 2% de ces plantes hypohaploïdes ont des feuilles panachées (photo 32) ou des feuilles entièrement blanches. Parmi les plantes à feuilles blanches, certaines ne fleurissent pas, même au bout de plusieurs années de croissance végétative.

2. Aspects cytologiques

Au niveau des pointes de racines, les nombres chromosomiques observés varient entre 2 et 24. La somme des cellules possédant 12 (photo 33) et 22 chromosomes représente environ 70% du total (fig.7).

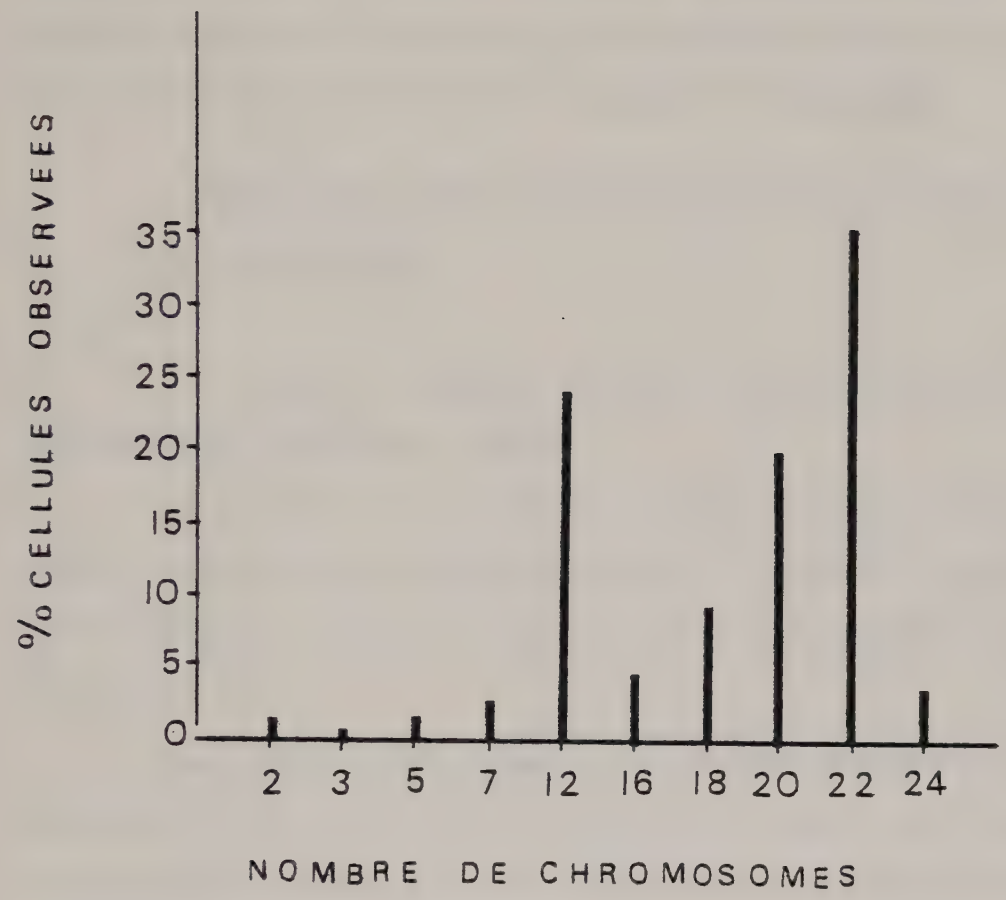


Fig.7. Fréquence des nombres chromosomiques observés dans les pointes de racines chez les plantes hypohaploïdes de N.tabacum.

- Nombre de cellules observées: 1000

Les fleurs anormales des plantes hypohaploïdes présentent des anthères dont la méïose des cellules-mères peut être étudiée: les nombres chromosomiques observés à la métaphase I varient entre 3 (photo 34) et 22 . Vers la fin de l'anaphase II, on observe quelquefois 4 groupes de 6 chromosomes. Ces 4 groupes sont liés deux par deux par des fuseaux achromatiques bien individualisés. Ceci semblerait montrer que la 2e division de la méïose peut se dérouler avec seulement 6 chromosomes.

3. Capacité embryogène des grains de pollen des plantes hypohaploides de lère génération

Les anthères prélevées sur les plantes hypohaploïdes de lère génération ne forment pas d'embryon.

Par contre, 5% des anthères formées in vitro à partir d'explants prélevés sur des plantes hypohaploïdes peuvent produire des embryons. Ceux-ci se développent en plantes que nous appelons hypohaploïdes de 2e génération (he_2-schéma 1).

Les nombres chromosomiques observés dans les pointes racinaires de ces plantes hypohaploïdes de 2e génération présentent les mêmes intervalles de variation que ceux des plantes hypohaploïdes de lère génération (2 à 24) avec une fréquence plus élevée de cellules présentant 12 chromosomes (68/72 cellules observées). Les autres nombres observés sont 2,14, 16,et 24.

Les plantes hypohaploïdes de 2e génération forment des fleurs anormales à pétales laciniés (photo 35). Dans certains cas les anthères de ces fleurs sont stigmatoïdes (photo 36) ou pétaloïdes (photo 37). Le nombre de grains de pollen contenus dans les anthères de ces fleurs est trés réduit (100 au lieu de 40 000 estimé par SUNDERLAND et WICKS, 1969 chez les anthères in vivo). De plus, ces 100 grains de pollen ne sont pas viables (les anthères mises en culture ne donnent jamais d'embryon).

Il faut signaler que des couches cellulaires minces prélevées sur les plantes hypohaploïdes de 2e génération cultivées in vitro donnent des fleurs. Nous n'avons jusqu'ici pas eu le temps d'étudier ces fleurs ni la qualité de leur pollen.

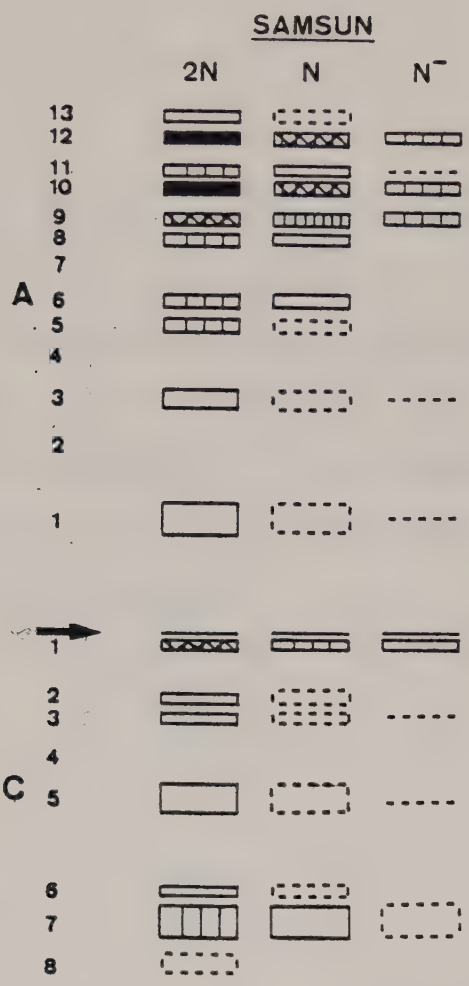
4. Quelques caractéristiques biochimiques de l'état hypohaploïde

Chez de nombreuses espèces, plusieurs auteurs ont montré que les peroxydases peuvent intervenir dans différentes phases de développement de la plante: la rhizogenèse (QUORIN et al., 1974; Van HOOF et GASPAR, 1976), le bourgeonnement (MADER, 1975; THORPE et al., 1978), l'induction florale (GASPAR, 1979). Elles peuvent être aussi utilisées comme marqueurs génétiques (SHEEN, 1970; TRINH et al., 1981). On sait également que l'activité peroxydasique est liée à des mutations morphologiques (SORESSI et al., 1974) et à des degrés de ploïdie (SCANDALIOS, 1974). Aussi, dans un premier temps, nous avons essayé d'étudier l'activité peroxydasique et le nombre d'isozymes des peroxydases des plantes hypohaploïdes.

Dans nos expériences, les résultats obtenus (fig.8) montrent que le nombre d'isozymes de peroxydases et l'activité peroxydasique sont plus réduits chez les plantes hypohaploïdes que chez les plantes haploïdes et diploïdes (0,92 contre 2,90 et 6,84 respectivement). Cependant, la différence des teneurs en protéines totales des plantes hypohaploïdes, haploïdes et diploïdes est peu importante (3,93 contre 4,41 et 4,36 respectivement).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus chez le Tabac par REDDY et GARBER (1971) et chez la Betterave par LOBOTSKAYA et ses collaborateurs (1968) et par SPETTOLI et ses collaborateurs (1976). Ils ont montré que la plus haute activité peroxydasique est observée chez les plantes tétraploïdes par rapport aux plantes diploïdes et triploïdes. L'activité peroxydasique est donc dépendante du degré de ploïdie.

Fig. 8. Activité peroxydasique aux différents niveaux de ploïdie chez N. tabacum var. Samsun



	2N	N	N⁻
PER.	29,05	13,02	3,65
PROT.	4,36	4,41	3,93
PER./PROT.	6,84	2,90	0,92

2N = plante diploïde

N = plante haploïde

N⁻ = plante hypohaploïde

PER = peroxydases (en µg)

PROT = protéines (en mg)

PER/PROT = Activité spécifique

La recherche de marqueurs biochimiques de l'état hypohaploïde se poursuit actuellement par l'étude d'autres enzymes en particulier ceux qui interviennent dans le fonctionnement des chloroplates tels que la ribulose biphosphate carboxylase, la ferridoxine réductase (WARGNER, Fribourg).

IV. Conclusion

Grâce à la culture in vitro nous avons pu obtenir des grains de pollen qui peuvent former des plantes hypohaploïdes. Ces plantes n'existent pas lorsque nous utilisons des grains de pollen formés chez les plantes-mères. Toutefois, on peut penser qu'un tel phénomène est rendu possible chez cette espèce amphidiploïde grâce à la présence des deux génomes N. sylvestris et N. tomentosiformis. Qu'advient-il si on utilise pour cette étude une espèce à caryotype simple, le N. plumbaginifolia?

B. N. plumbaginifolia

I. Plantes diploïdes (2n = 20)

1. Influence du stade d'évolution des grains de pollen sur l'androgenèse

Tout comme pour le N. tabacum, la capacité embryogène des grains de pollen dépend de leur stade de développement. Parmi tous les stades testés (1ère division, tétrade, uninucléé, binucléé) , seuls les grains de pollen au stade binucléé forment des plantes haploïdes (tableau 17).

Toutes conditions égales par ailleurs, le pourcentage des plantes haploïdes obtenues est toujours plus élevé à partir d'anthères formées in vitro (20%) qu'à partir d'anthères formées in vivo (3%).

Tableau 17. Influence du stade cytologique des grains de pollen sur la production des plantes haploïdes chez N.plumbaginifolia.

Taille des boutons floraux (cm)	Stade des grains de pollen		% d'anthères (in vivo et in vitro) formant des plantules	
	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro
0,4	lère division	tétrade	0	0
0,6	tétrade	uninucléé	0	0
0,8-1,00	uninucléé	uninucléé	0	0
1,00-1,20	uninucléé	binucléé (début)	0	20
1,20-1,40	binucléé (début)	binucléé	3	2
1,40-1,60	binucléé	binucléé (fin)	0	0
1,60-1,80	binucléé (fin)	grains de pollen à maturité	0	0

- Expériences réalisées à 27°C en 16h d'éclairement
- Nombre d'anthères par stade et par expérience : 200
- Nombre de répétitions : 4

2. Influence du milieu de culture sur l'androgenèse

Comme précédemment, 5 types de milieu (MB, "racine", "cal, "bourgeon", "fleur") ont été testés. Seul le milieu "bourgeon" permet l'obtention de plantes haploïdes. Sur les milieux "cal", "racine", "fleur", les grains de pollen forment des cals. Aucune division n'est observée chez les grains de pollen cultivés sur le milieu MB.

II. Plantes haploïdes (n = 10)

1. Aspects morphologiques et cytologiques

Les plantes haploïdes issues des anthères *in vivo* et *in vitro* fleurissent en serre une fois rempotées. Il est à signaler que leur taille ne représente que 1/4 de celle de plantes diploïdes (photo 8).

Les comptages chromosomiques effectués sur des pointes racinaires (photo 38) montrent que sur 12 plantes obtenues , 12 sont haploïdes si elles proviennent des anthères *in vitro* et 8 seulement sont haploïdes si elles proviennent des anthères *in vivo*. Les 4 restant sont diploïdes. Aucune plante mixoploIde ou aneuploïde n'est observée.

Au niveau des cellules-mères de tétraspores, on observe à la métaphase I que les nombres chromosomiques varient entre 8 et 10, mais la majorité des cellules ont 10 chromosomes (photo 39). A l'ana-télophase II, les nombres chromosomiques les plus fréquents sont 5, 6 (photo 40) et 7 (tableau 18).

Au stade tétrade, on observe des dyades (1%), tétrades (79%), quintades (17%) et hexades (3%). Les grains de pollen présentent des surfaces variables et ne germent pas.

Tableau 18. Nombres chromosomiques observés chez les cellules-mères de tétraspores de N.plumbaginifolia haploïde

Stade cytologique des cellules-mères de tétraspores	Nombre chromosomique	% de cellules observées
Métaphase I	8	0,10
	9	0,30
	10	99,60
Ana-télophase II	3	3,50
	4	2,00
	5	18,00
	6	36,00
	7	36,50
	8	3,20
	9	0,80

- Nombre de cellules observées à chaque stade : 1000

2. Capacité embryogène des grains de pollen

Les anthères haploïdes *in vivo* et *in vitro* sont mises en culture dans les mêmes conditions (grains de pollen au stade binucléé, milieu "bourgeon", 27°C). Seules les anthères *in vitro* forment des plantes dites "hypohaploïdes" (2%) parce que leurs cellules ont perdu un ou plusieurs chromosomes par rapport aux plantes haploïdes.

III. Plantes hypohaploïdes (n<10)

1. Aspects morphologiques et cytologiques

Les plantes hypohaploïdes sont de taille trés réduite : 4/5 de la hauteur des plantes haploïdes. 60% de ces plantes ont des feuilles vertes dont certaines sont longiformes, leur limbe est réduit à la nervure principale, 10% ont des feuilles panachées (photo 41) et 30% ont des feuilles entièrement blanches (photo 42). La morphologie des fleurs est très modifiée. Sur une même inflorescence on observe des fleurs avec 5, 4, 3, 2 ou 1 pétales laciniés (photo 43). Dans de rares cas, les fleurs portent un ovaire à feuilles carpellaires très réduites laissant apparaître des ovules nus (photo 44).

Le comptage effectué sur des pointes racinaires montre que 10% et 90% des cellules ont respectivement 8 (photo 45) et 9 chromosomes. On observe aussi un petit nombre (0,1%) de cellules à 7 chromosomes (chez les plantes hypohaploïdes albinos).

A la différence des pointes de racines, les cellules-mères des tétraspores présentent une variation plus importante du nombre chromosomique. En effet, à la métaphase I, on observe des cellules avec des nombres chromosomiques variant de 5 à 10. Le nombre de bivalents varie de 1 (photo 46) à 4 (photo 47). Il faut souligner que le nombre chromosomique le plus fréquent

(42%) est 5 (photo 48). A l'ana-télophase II, les chromosomes se dispersent irrégulièrement en groupes de 2, 3 (photo 49), 4, 5 ou 7 chromosomes avec une fréquence plus élevée pour les nombres 2, 3 et 4 (tableau 19). On peut observer des chromosomes de très petite taille à côté de chromosomes de taille normale (photo 50).

L'hétérogénéité de taille des chromosomes est souvent observées chez les hybrides interspécifiques (GERSTEL et BURNS, 1966, 1976; COLLINS, 1967) ou chez les plantes irradiées (WILSON et SPARROW, 1960). Il s'agit de méga-chromosomes formés par amplification de séquences (COLLINS et al., 1970). Ces méga-chromosomes peuvent être 15 fois plus longs que des chromosomes normaux. Cependant on ne trouve pas dans la littérature l'existence des chromosomes à petites tailles par rapport aux tailles normales.

Au stade tétrade, en plus des tétrades, on observe des quintates et hexades (photo 51) avec des noyaux inégaux. Les grains de pollen ont une taille variable (photo 52) et ne germent pas.

Leurs surfaces * sont plus réduites que celles des grains de pollen diploïdes et haploïdes . Les surfaces les plus fréquentes des grains de pollen des plantes hypohaploïdes se situent autour de 40 (unité arbitraire), alors que les surfaces les plus fréquentes des grains de pollen haploïdes et diploïdes se situent respectivement autour de 60 et 100 (fig.9).

---

* Ce travail a été réalisé en collaboration avec Dr. KNOX, Université de Melbourne, Australie. Les anthères sont écrasées dans une goutte de solution de Calberla, (OGDEN, 1974). Les surfaces des grains de pollen sont mesurées à l'aide d'un computeur vidéoplan Carl Zeiss.

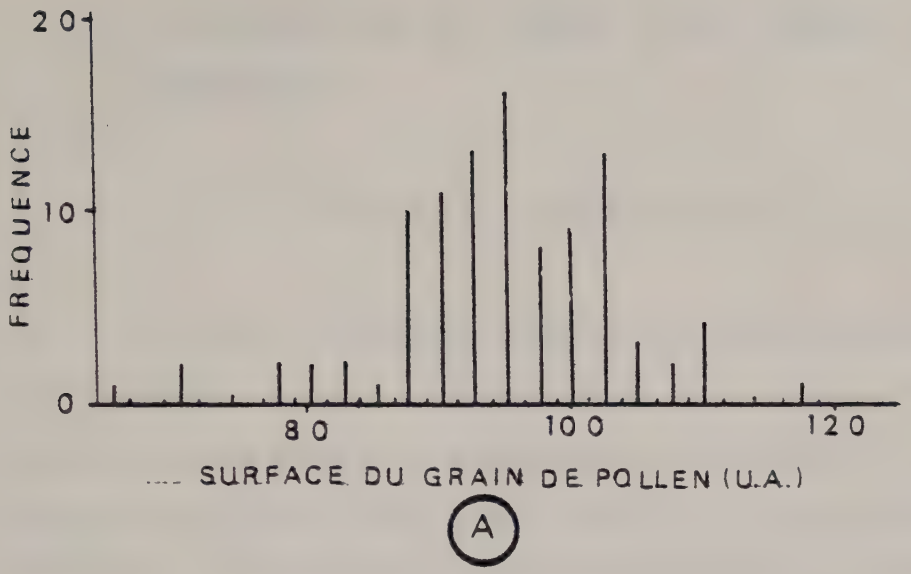
Tableau 19. Nombres chromosomiques observés chez les cellules-mères des tétraspores de N.plumbaginifolia hypohaploïde

Stade cytologique des cellules-mères de tétraspores	Nombre chromosomique	% de cellules observées
Métaphase I	5	42,00
	6	12,00
	7	17,00
	8	24,00
	9	4,00
	10	1,00
Ana-télophase II	2	25,00
	3	27,20
	4	26,40
	5	14,70
	6	3,80
	7	2,90

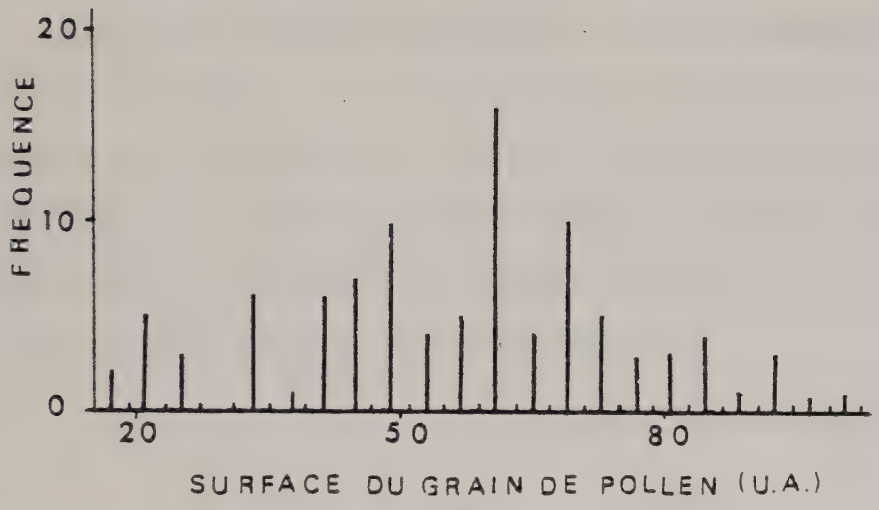
- Nombre de cellules observées à chaque stade : 1000

Fig. 9 Surfaces des grains de pollen observées chez le N. plumbaginifolia diploïde (A), haploïde (B), et hypohaploïde (C).
(100 grains de pollen sont mesurés à chaque niveau de ploïdie).

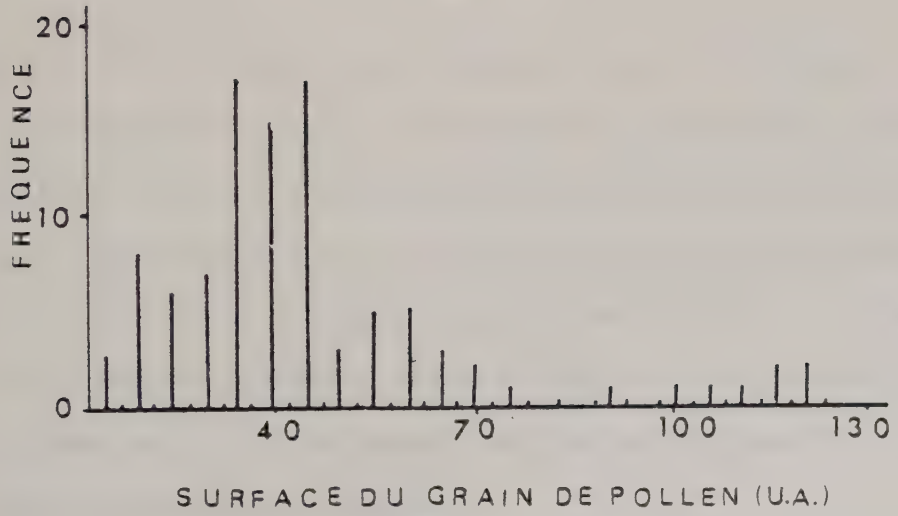
FIG. 9


20
10
0
FREQUENCE
80
100
120
SURFACE DU GRAIN DE POLLEN (U.A.)

A


20
10
0
FREQUENCE
20
50
80
SURFACE DU GRAIN DE POLLEN (U.A.)

B


20
10
0
FREQUENCE
40
70
100
130
SURFACE DU GRAIN DE POLLEN (U.A.)

C

2. Remarques sur les plantes albinos obtenues parmi les plantes hypohaploïdes.

a. Génétique du caractère albinos

On peut se demander si la déficience chlorophyllienne est dépendante d'une hérédité nucléaire ou cytoplasmique. Aussi des croisements réciproques ont été réalisés entre N. plumbaginifolia vert diploïde et N. plumbaginifolia albinos hypohaploïde après le doublement de son nombre chromosomique par la colchicine. Il faut noter que malgré le doublement du nombre de chromosomes, les plantes albinos restent entièrement blanches.

Les F_1 sont toutes identiques et vertes (caractère vert dominant). Au niveau F_2 (tableau 20) , 25% des plantes sont albinos et 75% sont vertes. Il s'agit donc d'une hérédité nucléaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le Maïs par RHOADES (1938), Mc CLINTOCK (1944) et chez le Tabac par CLAUSEN et CAMERON (1950) et MOAV (1957): la perte ou le changement d'un gène provoque une déficience chlorophyllienne.

b. Etude ultrastructurale

Au niveau des plastes, des différences importantes de l'ultrastructure ont été observées chez les feuilles albinos comparées aux feuilles vertes. Les systèmes lamellaires des chloroplastes présents dans les feuilles vertes (photo 53) sont absents chez les feuilles albinos. Dans les feuilles albinos, les chloroplastes demeurent sous la forme de proplastes où les lamelles granaires ne sont pas ou peu individualisées. Un corps prolamellaire très développé ainsi que de nombreuses vésicules sont observées chez ces proplastes (photo 54).

Tableau 20.Ségrégation en F_2 des croisements entre N.plumbaginifolia vert et albinos.

Croisements F_1 autofécondés	Nombre des plantes observées		Pourcentage	
	Vertes	Albinos	Vertes	Albinos
verte x albinos ♀ ♂	85	29	74,56	25,44
albinos x verte ♀ ♂	282	73	79,43	20,57

Nous signalons qu'une étude portant sur les acides gras (TREMOLIERES, résultats non publiés) n'a pas permis de déceler de différences quantitatives significatives au niveau des acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et α-linolénique entre les feuilles vertes et les feuilles albinos.

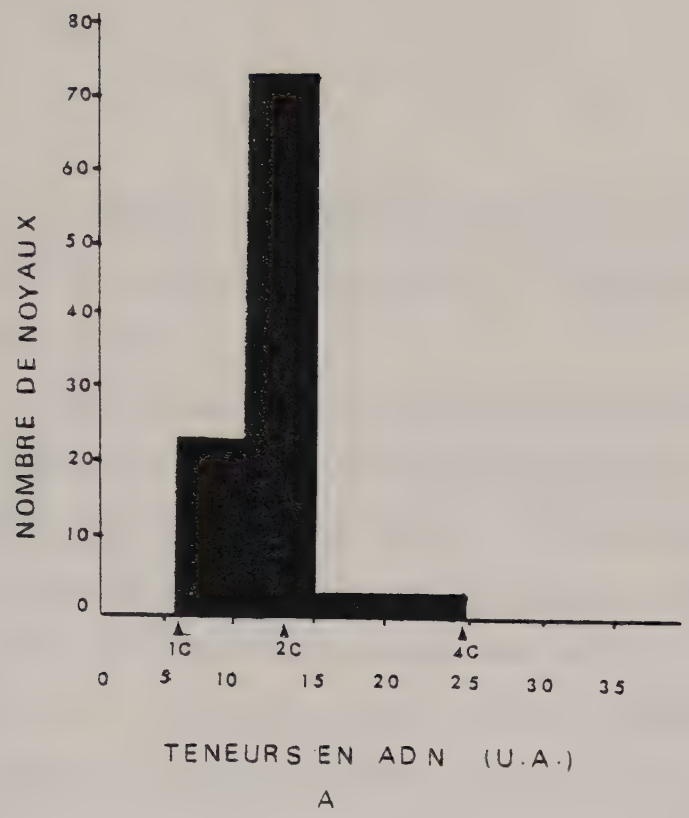
3. Teneurs en ADN mesurées par la méthode densitométrique

Les résultats groupés dans la fig. 10 montrent que les contenus en ADN des noyaux hypohaploïde et haploïde sont tous les deux voisins de la valeur 1c, tandis que le contenu en ADN du noyau diploïde est voisin de la valeur 2c. Il ne nous a donc pas été possible de mettre en évidence des différences significatives entre les teneurs en ADN nucléaire des feuilles haploïdes d'une part et hypohaploïdes d'autre part. On peut supposer que le nombre de chromosomes perdus chez les plantes hypohaploïdes (1 ou 2) est trop faible par rapport au nombre de chromosomes présents (8 ou 9) pour que la teneur en ADN accuse des modifications décelables par les techniques de coloration utilisées (Feulgen).

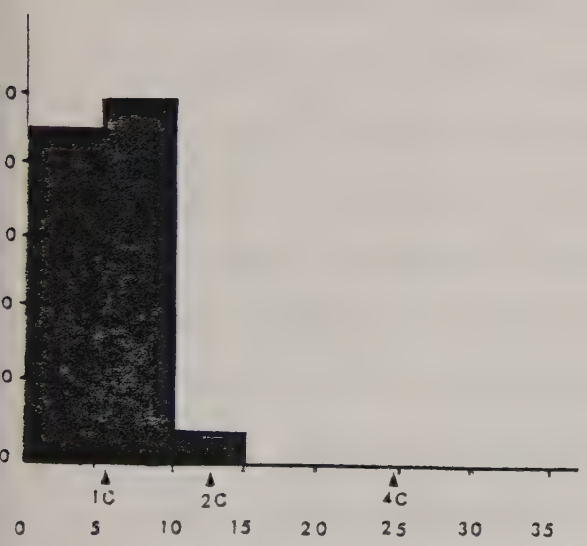
IV. Conclusion

Comme chez N. tabacum, chez N. plumbaginifolia, nous pouvons obtenir des plantes hypohaploïdes grâce aux grains de pollen des anthères haploïdes formées in vitro. Ces plantes hypohaploïdes ont deux caractères particuliers: la déficience chlorophyllienne qui est sous la dépendance du noyau et la modification morphologique des feuilles et des fleurs (surtout au niveau de l'ovaire).

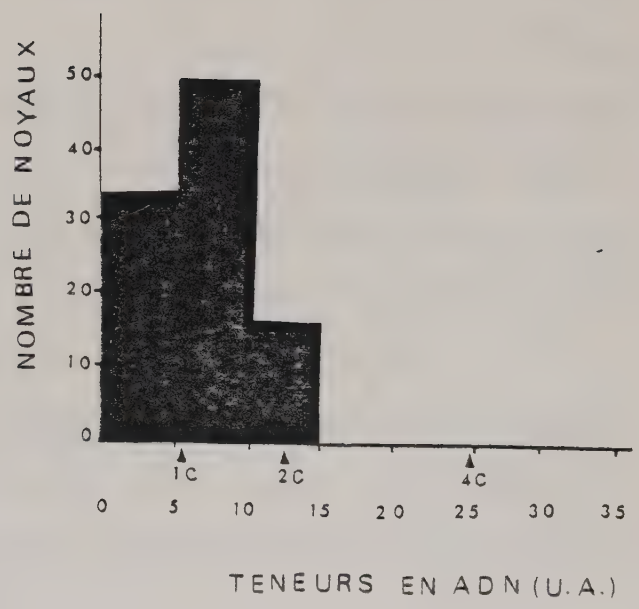
Fig.10. Mesure densitométrique de l'ADN nucléaire chez les feuilles de N. plumbaginifolia aux niveaux diploïde (A), haploïde (B) et hypohaploïde (C).



A



B



C

Il serait intéressant de savoir si cette modification morphologique est sous-la dépendance du noyau ou du cytoplasme.

C. Conclusion

Chez les 2 espèces de Nicotiana étudiées ici, nous avons montré que les grains de pollen in vitro sont plus aptes à l'embryogenèse que les grains de pollen formés in vivo.

Or, les grains de pollen formés in vitro le sont à partir d'un système expérimental simplifié soumis à des conditions de culture bien précises. Leur meilleure capacité embryogène pourrait résulter de l'appariement chromosomique qui a été plus fréquemment observé in vitro qu'in vivo au niveau des cellules-mères des plantes haploïdes. Ceci pourrait résulter de la moindre complexité des corrélations qui interviennent dans l'explant, comparé à la plante-mère.

Ceci pourrait aussi résulter des conditions de culture in vitro et notamment de la rapidité avec laquelle les fleurs sont formées après la mise en culture, sans différenciation complexe d'organes.

Un début de preuve est fourni par la comparaison de l'ultrastructure des anthères et des grains de pollen formés in vivo et in vitro: l'assise tapétale des anthères in vitro persiste plus longtemps que celle des anthères in vivo. Les structures des mitochondries et des plastes, la taille des grains d'amidon et celle des vacuoles des grains de pollen formés in vitro (VAZART, résultats non publiés) se retrouvent chez les grains de pollen formés in vivo mais beaucoup plus tard dans leur évolution, lorsqu'ils sont en cours d'évolution vers l'embryogenèse depuis 2 à 4 jours (VAZART, 1973).

Donc les anthères formées in vitro semblent préparées prématurément pour l'embryogenèse, avant même d'être mises en culture. C'est peut-être pourquoi on peut observer des appariements chromosomiques qui n'existent pas

chez les témoins (in vivo). C'est peut-être aussi pourquoi on peut obtenir des plantes hypohaploïdes seulement à partir d'anthères in vitro.

Les plantes hypohaploïdes ont des fleurs aux phénotypes très particuliers: pétales laciniés, anthères stigmatoïdes et pétaloïdes. Ces fleurs sont plus ou moins analogues à celles obtenues par une série de croisements entre N. debneyi et N. tabacum d'une part et entre N. plumbaginifolia et N. tabacum d'autre part (voir première partie). Dans ces deux cas, un déséquilibre cytoplasme-noyau a été introduit. On peut penser par analogie que les phénotypes particuliers observés chez les plantes hypohaploïdes pourraient résulter d'une perturbation comparable de l'équilibre noyau-cytoplasme.

Insistons enfin sur le fait que nous n'avons jamais obtenu de plantes hypohaploïdes possédant un nombre fixe et stable de chromosomes. Nous obtenons toujours une chimère.

Remarquons toutefois que,toujours,certaines cellules ont un nombre chromosomique haploïde. Nous pouvons donc penser que les plantes hypohaploïdes peuvent survivre en l'absence de certains chromosomes grâce aux cellules qui possèdent un nombre chromosomique suffisant pour assurer le fonctionnement de leur métabolisme.

DISCUSSION

I. Différenciation de fleurs in vivo

Nous avons vu dans la première partie de ce travail que la confrontation dans un même individu du génome de N. tabacum et du cytoplasmone dont l'origine provient de N. plumbaginifolia entraîne des modifications morphologiques des étamines. Ce phénomène a été aussi observé chez d'autres hybrides obtenus par des croisements classiques (CLAYTON, 1950) ou par la fusion de protoplastes (BELLIARD et PELLETIER, 1978). Toutefois chez ces hybrides on n'a jamais observé la formation d'ovules à la place des grains de pollen.

Il est intéressant de noter que des modifications de la morphologie florale et du degré de stérilité mâle cytoplasmique peuvent être induites par certaines associations de gènes . Ainsi la restauration de la fertilité est obtenue par l'introgression d'un fragment de chromosome de N. debneyi dans l'un des chromosomes de N. tabacum (SAND, 1978). GRUN(1970) a aussi montré chez Solanum tuberosum qu'un gène particulier induit des modifications de la forme de la fleur et de la stérilité mâle.

A priori, les ADN chloroplastiques aussi bien que les ADN mitochondriaux peuvent intervenir dans le contrôle de la stérilité mâle cytoplasmique. En effet, si on introduit chez un Colza (Brassica napus) mâle-stérile le cytoplasme du Radis japonais (Raphanus sativus), une déficience chlorophyllienne d'origine maternelle s'ajoute à la stérilité mâle (BANNEROT et al., 1974). Chez cet hybride, le génome chloroplastique intervient dans la déficience chlorophyllienne, et le génome mitochondrial dans la stérilité mâle (VEDEL et al., 1982, 1983). On sait aussi que le génome mitochondrial détermine la stérilité mâle chez le Maïs (LEVINGS et PRING, 1976; PRING et

LEVINGS, 1978). Pour certains auteurs (FRANKEL et al., 1979), le génome chloroplastique joue ce rôle chez le Nicotiana (FRANKEL et al., 1979). Cependant, par la méthode de fusion de protoplastes de N. debneyi x N. tabacum et N. tabacum, BELLIARD et ses collaborateurs (1979) ont conclu que la stérilité mâle est déterminée par l'ADN des mitochondries.

Les modifications morphologiques observées chez les hybrides réciproques de N. plumbaginifolia et de N. tabacum peuvent être plus qu'une stérilité mâle: tout se passe comme si le primordium d'une étamine était un bourgeon floral modifié: il peut, en se développant, engendrer des pièces foliaires (étamine pétaloïde),des appendices à allure de styles et terminés par des stigmates papilleux ("étamine stigmatoïde"). Il est potentiellement bisexué puisque, si les ovules ne sont pas associés à des feuilles carpellaires, ils n'en sont pas moins normaux (des plantes haploïdes ont été obtenues par leur culture in vitro). Il n'est pas rare non plus d'observer des loges polliniques, certes anormales, mais renfermant des grains de pollen non viables. Il serait intéressant de savoir si les ADN mitochondrial et chloroplastique de N.plumbaginifolia sont bien ceux de la lignée alloplasmique. Par ailleurs, pour déterminer si les chloroplastes ou les mitochondries sont responsables des anomalies, il faudrait par fusion de protoplastes, isoler des cybrides ségrégeant les mitochondries et les chloroplastes des deux partenaires (BELLIARD et PELLETIER, 1978).

II. Différenciation de fleurs in vitro

Plusieurs facteurs exercent une influence très importante sur la néoformation de fleurs in vitro.

1. Etat physiologique de la plante-mère

L'obtention systématique de fleurs néoformées in vitro a été décrite par CHOUARD et AGHION (1961). Il se dégage de ces travaux l'hypothèse d'un gradient physiologique de la floraison existant le long d'une plante de Tabac. De plus, dans nos expériences, pour les génotypes favorables à la formation de fleurs in vitro, le fait de s'écarter faiblement de l'état physiologique optimal (stade "fruit vert") de la plante-mère entraîne soit l'annulation totale du "programme fleur", soit la formation d'un mélange de bourgeons végétatifs et de fleurs. Ceci pourrait s'interpréter à la lumière d'analyses biochimiques effectuées sur les plantes-mères. CABANNE et ses collaborateurs (1977) ont montré chez le N. tabacum var. Xanthi que le stade de développement de la plante-mère est corrélé à la composition qualitative et quantitative en phénolamines de l'apex. VALLEE et ses collaborateurs (1969) ont montré qu'il existe un gradient de proline le long de la tige. De même, le long de la tige, a été mis en évidence un gradient des concentrations endogènes en isoperoxydases (THORPE et al., 1978) et de la teneur en ADN (WARDELL, 1976; CIONINI et TRAN THAN VAN, résultats non publiés).

Il est difficile actuellement de savoir si tous ces caractères sont de simples marqueurs ou si certains d'entre eux sont liés causalement aux réactions morphogénétiques.

2. Rôle de certains facteurs de l'environnement

A côté de l'état physiologique de la plante-mère, la différenciation est étroitement dépendante de la température: une différence de 2°C diminue le pourcentage des explants formant des fleurs de 100 % à 60 % et à 45 %

respectivement chez le N. tabacum et N. plumbaginifolia. Ces résultats sont en accord avec ceux de TANIMOTO et HARADA (1979).

Quant à l'éclairement, continu ou court, il n'a pas d'influence sur la néoformation de fleurs chez les plantes indifférentes. Il diminue légèrement la néoformation chez les plantes à exigence de jours longs préférente (N. plumbaginifolia). Cette conclusion n'a pas de portée générale puisque CHLYAH (1974b) puis TANIMOTO et HARADA (1979) ont montré que la photopériode courte est plus favorable à la formation de fleurs in vitro chez le Torenia, plante indifférente.

Par contre, dans tous les cas l'absence totale d'éclairement inhibe la formation de fleurs in vitro. Le besoin de lumière n'est pas permanent pendant toute la culture. COUSSON (1980) a montré qu'il n'est essentiel que du 6e au 11e jour après la mise en culture.

3. Facteurs génétiques

N. tabacum issu de deux espèces parentales N. sylvestris et N. tomentosiformis forme des fleurs in vitro. Dans nos conditions expérimentales, cette capacité ne s'exprime chez aucune des espèces parentales; nous avons fait l'hypothèse que certaines interactions entre les deux génomes permettraient la formation de fleurs in vitro. Le fait suivant est favorable à cette idée: nous savons induire la néoformation de fleurs in vitro chez l'hybride interspécifique N. sylvestris x N. tomentosiformis . Le pourcentage est encore faible (30 %) . Ceci pourrait être attribué à une expressivité d'un système de réponse au milieu plus grande pour N.tabacum évolué que pour l'hybride récement créé: un certain temps de coexistence des deux génomes

serait nécessaire pour l'expression intégrale des interactions génomiques. Il est à signaler que le doublement du nombre chromosomique de cet hybride N. sylvestris x N. tomentosiformis n'a pas permis d'augmenter le pourcentage d'explants formant des fleurs in vitro.

Les pourcentages (60 % et 75 %) de néoformation de fleurs chez les hybrides N. tabacum x N. sylvestris et N. tabacum x N. tomentosiformis semblent montrer une meilleure interaction génomique. Celle-ci n'est cependant pas aussi bonne que chez N. tabacum (100 %). Seul l'hybride N. sylvestris x N. tabacum (N. sylvestris utilisé comme parent femelle) a permis la néoformation de fleurs chez 100 % des explants.

En comparant ceci avec les résultats obtenus chez l'hybride réciproque N. tabacum x N. sylvestris, on peut penser que c'est l'effet paternel de N. tabacum qui intervient dans la néoformation de fleurs.

Chez les deux hybrides interspécifiques (PT ou TP), l'expression florale in vitro est celle du parent maternel. Par contre, chez les rétrocroisements successifs, cette expression florale dépend du parent paternel. Donc le type de la néoformation de fleurs in vitro chez les hybrides interspécifiques et chez leurs rétrocroisements dépend étroitement de l'interaction nucléo-cytoplasmique.

L'effet maternel sur la capacité à former des fleurs est aussi observé par IGNART (1981) chez le Pétunia: cet auteur a montré que les deux espèces parentales (TL + h_6 et Sfa) ne sont pas capables de former des fleurs in vitro. Seul l'hybride ayant comme parent femelle TL + h_6 possède cette propriété. L'effet maternel est également manifesté dans la formation de bourgeons in vitro chez un hybride de Tomate (OHKI et al., 1978): partant de deux espèces présentant des aptitudes différentes au bourgeonnement in vitro, ces auteurs effectuent deux croisements réciproques. L'hybride résultant ne

peut régénérer intensément des bourgeons que si le parent femelle choisi possède la plus grande aptitude à la caulogenèse. Ces résultats sont analogues à ceux obtenus par TABATA et MOTOYOSHI (1965) sur la formation de cals à partir d'endosperme de Maïs.

Cependant l'effet paternel observé dans nos expériences peut être comparé avec celui que nous avons observé chez l'hybride N. debneyi x N. tabacum (KAMATE et al., 1981). Nous avons montré que cet hybride forme des fleurs sessiles alors que N. debneyi et N. tabacum forment respectivement des pousses feuillées florales et des fleurs sessiles.

Parmi les facteurs génétiques intervenant dans la néoformation de fleurs, le niveau de ploïdie n'est pas exclu: nous avons montré que la capacité de néoformation florale est d'autant plus intense que le degré de ploïdie est bas. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par BINDING (1971) chez le Petunia et par SOPORY et MAHESHWARI (1975) chez le Datura. En effet, ces auteurs ont montré que les fragments haploïdes sont mieux adaptés à la néoformation de bourgeons que les fragments diploïdes. Pour le cas du Brassica napus, STRINGHAM (1974) a également montré que des fragments haploïdes sont plus aptes à la rhizogenèse que des fragments diploïdes. De plus, chez le N. tabacum, MURASHIGE et NAKANO (1965) ont montré que plus le degré de ploïdie augmente au cours de repiquages moins les explants sont capables d'organogenèse.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus démontre l'importance du degré de ploïdie des tissus mis en culture (en particulier des tissus hypohaploïdes) sur la capacité à régénérer des fleurs.

4. Variations dans la culture de tissus

Il a été montré que des plantes régénérées à partir de culture de tissus présentent une grande variabilité de la morphologie (PELLETIER et

PELLETIER, 1971 ; SIBI, 1976; GREEN, 1977 ; BARBIER et DULIEU, 1983), du nombre chromosomique (TORREY, 1967; SACRISTAN et MELCHERS, 1969), de la teneur en alcaloïdes (ZENK et al., 1977), en lectines(MEIMETH et al., 1982) et de la fertilité (SAWHNEY et GREYSON, 1973; MAJUMDAR, 1970).

En effet, il a été montré (BARBIER et DULIEU, 1980) ,

que des variants chlorophylliens et morphologiques peuvent être induits au cours de la multiplication in vitro. Cette variabilité importante au début de la culture se stabilise progressivement.

De plus , GENGENBACH et ses collaborateurs (1977),BRETTELL et ses collaborateurs (1980) ont montré qu'à partir du scutellum immature d'un génotype de Maïs mâle-stérile (Texas) mis en culture, on peut obtenir des cals puis des plantes fertiles. Au laboratoire, OUEDRAOGO a obtenu (cité par TRAN THANH VAN et TRINH, 1978), bien que sporadiquement, une restauration de la fertilité sur des anthères obtenues à partir de couches cellulaires minces des plantes mâle-stériles issues de rétrocroisements entre (N.debneyi x N.tabacum) et N. tabacum.

Par contre, nous avons montré que, chez les rétrocroisements (BC_2 et BC_3), entre (N.plumbaginifolia x N.tabacum) et N.tabacum, les fleurs formées in vitro, conservent le "caractère mâle-stérile avec des ovules nus" de la plante-mère. L'absence de restauration de fertilité, après culture in vitro de nos hybrides, serait-elle due au délai trop court d'obtention de fleurs (14 jours environ) ? On pourrait donc à l'avenir tenter d'induire des cals sur des couches cellulaires minces des hybrides mâle-stériles à ovules nus, et régénérer ensuite des bourgeons. Une interaction plus importante du milieu de culture avec le complexe génome-cytoplasme ainsi réalisée pourrait peut être alors permettre l'obtention de plantes fertiles.

III. Intérêt et particularité des anthères formées in vitro

a. Obtention de plantes hypohaploïdes

Nous avons apporté la preuve que les plantes hypohaploïdes sont différentes des plantes haploïdes. Et ceci est vrai aussi bien lorsque les matériels utilisés sont des amphidiploïdes (N.tabacum) que des diploïdes vraies (N.plumbaginifolia). Cette potentialité nouvelle est indissociable d'une certaine "qualité" de la méïose in vitro. En effet,on constate, au niveau diploïde, que le pourcentage d'anthères in vitro formant des plantes haploïdes est significativement plus élevé que celui des anthères in vivo. Cette différence est encore plus accentuée au niveau haploïde pour lequel seules les anthères haploïdes in vitro peuvent former des plantes hypohaploïdes. On peut se demander si ceci est dû à l'influence exercée par les milieux de culture et/ou à la rupture de corrélations provoquée par l'excision de l'explant. En effet, il a été montré que des facteurs externes tels que la température, peuvent influencer les associations de chromosomes (KOSTOFF, 1943) et la capacité embryogène (DUNWELL et PERRY, 1973). Dans cet ordre d'idées, nous avons montré, au niveau haploïde, que le nombre de bivalents et d'associations chromosomiques est plus élevé in vitro qu'in vivo.

Le phénomène d'hypohaploïdisation pose de nombreuses questions qui sont loin d'être résolues. En voici quelques-unes:

-comment peut-on comprendre la signification de l'éventail des variations du nombre chromosomique, tel que nous l'avons observé ?

-Peut-on isoler des plantes avec un nombre stable de 12 (N.tabacum) ou 5 (N.plumbaginifolia) chromosomes ?

b. Caractéristiques des plantes hypohaploïdes

Des plantes hypohaploïdes présentent des phénotypes particuliers au niveau des feuilles (déficience chlorophyllienne) et des fleurs (pétales laciniés, anthères stigmatoïdes et pétaloïdes).

La déficience chlorophyllienne est souvent observée chez les monocotylédones haploïdes tels que l'Oryza sativa (NIIZEKI et OONO, 1968), le Triticum aestivum (PICARD et BUYSER, 1973), l'Hordeum vulgare (CLAPHAM, 1973). Mais chez le Nicotiana, ce phénomène est plus fréquent chez les mutants obtenus par traitement chimique (DULIEU, 1967) ou par irradiation (MENCZEL et al., 1982; SIDOROV et al., 1981). Pour un nombre réduit de cas, ce phénomène peut être observé chez des hybrides interspécifiques. Ainsi, à la suite de rétrocroisements entre N. plumbaginifolia x N. tabacum et N. tabacum, MOAV (1957) a obtenu des plantes à secteurs albinos dont le chromosome portant le gène WS a dû être perdu. Cet auteur établit une corrélation entre la déficience chlorophyllienne et l'absence du chromosome portant le gène WS de N.plumbaginifolia.

Les plantes albinos obtenues par hypohaploïdisation peuvent être considérées comme un matériel intéressant pour l'étude de la biosynthèse des pigments et en particulier celle de la chlorophylle. Il n'est pas exclu que l'absence du chromosome entraînant la synthèse chlorophyllienne soit aussi responsable de modifications dans le métabolisme secondaire (celui de la synthèse des alcaloïdesnicotiniques,CHAPLIN et FORD, 1965).

Il est intéressant de noter que deux procédés différents, les croisements d'une part, et les méïoses *in vitro* (notre méthode d'hypohaploïdisation) d'autre part, ont permis d'obtenir des résultats comparables: la perte d'un chromosome possédant un marqueur. La première méthode nécessite l'obtention de plantes issues de rétrocroisements. Par contre, la deuxième méthode est plus rapide et permet de travailler avec le cytoplasme et le génome de la même espèce.

Quant à la modification morphologique des fleurs, nos résultats sont analogues à ceux obtenus chez des hybrides mâle-stériles cytoplasmiques, par rétrocroisements. Chez ces hybrides, les modifications morphologiques des fleurs résultent de la coexistence du génome d'une espèce avec le cytoplasme d'une autre. Cette coexistence entraîne une perturbation de l'équilibre entre le noyau et le cytoplasme. Ce fait indiquerait que chez les hypohaploïdes il pourrait y avoir, au sein de la même espèce, une perturbation de l'équilibre entre le noyau et le cytoplasme.

Enfin, il est intéressant de souligner que, par hypohaploïdisation, nous avons obtenus, d'une part, chez le *N. tabacum* des fleurs rappelant celles d'une des deux espèces parentales, d'autre part, chez le *N. plumbaginifolia* des fleurs à ovules nus dues à la réduction des feuilles carpellaires et des feuilles à limbe très réduit à nervure unique. Toutes ces caractéristiques des plantes hypohaploïdes évoquent un retour vers les formes moins évoluées.

IV. Quelques hypothèses suscitées par la culture d'ovules

La production des plantes haploïdes à partir de culture d'ovaires a été obtenue pour la première fois chez l'*Hordeum vulgare* par SAN NOEUM (1976).

Par la suite, la gynogenèse a été étendue à d'autres espèces: N. tabacum, Triticum aestivum (ZHU et WU, 1979), et Oryza sativa (ZHOU et YANG, 1981).

Chez les hybrides mâle-stériles cytoplasmiques (BC_3) que nous avons obtenus et dont les grains de pollen sont totalement avortés, la culture d'ovules est le seul moyen d'obtenir des plantes haploïdes.

Dans nos conditions de culture, au niveau BC_3 de croisement entre N. plumbaginifolia x N. tabacum et N. tabacum, seuls les ovules nus formés sur des anthères stigmatoïdes sont capables de produire des plantes haploïdes, tandis que les ovules normaux (ovariens) de ces mêmes plantes (BC_3) n'en sont pas capables.

Or on sait que les structures des ovules nus et des ovules ovariens sont analogues. Seules les positions de ces deux types d'ovules sont différentes: les ovules nus sont initiés sur des anthères et prennent la place des grains de pollen. On sait aussi que d'une part les gamètes mâles et femelles ne contiennent pas les mêmes teneurs en auxines et en cytokinines (KAHLEM et al., 1975) et d'autre part, les hormones jouent un rôle très important dans l'expression du sexe (HESLOP-HARRISON, 1956). On pourrait donc penser que le contexte biochimique, en particulier les auxines et les cytokinines, n'est pas le même pour les ovules nus et les ovules ovariens et donc les teneurs en phytohormones exogènes nécessaires pour l'obtention des plantes haploïdes ne sont pas les mêmes pour les deux cas.

Dès lors, on peut penser qu'en ajustant la concentration et la nature des phytohormones, on pourrait obtenir des plantes haploïdes à partir d'ovules ovariens.

CONCLUSION

I. Aptitude à former des fleurs in vivo et in vitro au cours des croisements

Dans la transmission de l'aptitude à former des fleurs in vivo et in vitro, l'importance du cytoplasme constitue le fait le plus intéressant de notre étude. Toutefois, le rôle du génome n'est pas négligeable.

Chez les fleurs formées in vivo, le cytoplasme est la voie de transmission de la stérilité mâle.

Quant à la formation de fleurs in vitro, si le dosage génomique des deux espèces parentales est égale à 1, c'est le parent femelle qui détermine le phénotype floral. Par contre, ce phénotype dépend du parent mâle quand le dosage génomique d'une des deux espèces devient dominant. D'où l'importance de l'interaction génome-cytoplasme.

II. Barrage haploïde

Le barrage haploïde qui, jusqu'ici rend impossible la régénération d'embryons à partir de grains de pollen résultant de méïoses de cellules haploïdes a pu être levé grâce à l'appariement chromosomique existant dans les méïoses induites in vitro sur couches cellulaires minces haploïdes.

Les plantes hypohaploïdes ont des caractères particuliers: la déficience chlorophyllienne et des modifications morphologiques des fleurs. De plus, leurs cellules ont perdu 1 ou plusieurs chromosomes par rapport aux plantes haploïdes.

PERSPECTIVES

A partir de ces résultats, nous pouvons considérer plusieurs perspectives.

1- Chez les plantes hypohaploïdes, certains aspects suivants méritent d'être développés:

- La comparaison de la structure et de l'expression du génome aux niveaux diploïde, haploïde et plus particulièrement hypohaploïde est fondamentale.

Au niveau des méïoses des plantes hypohaploïdes, on a observé un pourcentage élevé des cellules avec un nombre chromosomique anormalement réduit (2, 3, 4 chromosomes). Ces cellules pourraient être une source potentielle pour sélectionner des clones cellulaires ayant ces nombres chromosomiques réduits (par la méthode de culture de protoplastes par exemple).

- On sait que les cellules des plantes hypohaploïdes ont perdu 1 ou plusieurs chromosomes. On sait aussi que certaines plantes hypohaploïdes ont deux caractères particuliers (déficience chlorophyllienne et modifications morphologiques des feuilles et des fleurs).

On peut se demander si les gènes codant pour ces deux caractères sont ou non sur le même chromosome. L'étude de l'identification de chromosomes par la méthode de "banding" pourrait apporter des éléments de réponse à cette question.

2- Chez les plantes mâle-stériles cytoplasmiques, nous pouvons explorer les pistes suivantes:

- Disposant d'un modèle expérimental présentant, en plus des ovules intraovariens, des ovules nus in vivo induits à être différenciés sur des territoires cellulaires normalement programmés pour former des grains de pollen, il serait intéressant d'étudier dans ce cas précis les problèmes de reconnaissance directe pollen-ovule, les ovules étant maintenus enplace sur la plante-mère et/ou excisés. Ce modèle, différent du cas des ovules intraovariens excisés et mis en culture pour l'étude de la fécondation in vitro (DULIEU, 1963; HAVEL et NOVAK, 1981) apporterait des données supplémentaires concernant les problèmes de viabilité et de survie des embryons.

- L'obtention d'une stérilité mâle particulière avec formation d'ovules nus sur des "étamines modifiées" pose le problème du déterminisme de cette forme particulière de stérilité mâle. Les génomes mitochondriaux et chloroplastiques ont déjà été étudiés dans le cas classique de stérilité mâle (FRANKEL et al., 1979; BELLIARD et al., 1979). Il serait intéressant de comparer les ADN mitochondrial et chloroplastique de différents rétrocroisements montrant toute une gamme de progression depuis la stérilité mâle classique jusqu'à cette forme particulière de stérilité mâle que nous avons obtenue. En effet, on peut évoquer le fait que chez une espèce voisine du Nicotiana, le Solanum, si en général les plastes disparaissent lors de la maturation de la cellule génératrice, les mitochondries persistent (CLAUHS et GRUN, 1977).

Enfin, les problèmes de coopération entre génomes nucléaire, chloroplastique et mitochondrial sont intéressants à être étudiés aussi bien chez les rétrocroisements que chez les hypohaploïdes.

BIBLIOGRAPHIE

ABO EL-NIL M.M. et A.C.HILDEBRANDT, 1973. Origin of androgenetic callus and haploid geranium plants. Can.J.Bot. 51: 2107-2109.

ABO EL-NIL M.M. , A.C.HILDEBRANDT et R.F. EVERT, 1976. Effect of auxin-cytokinine interaction on organogenesis in haploid callus of Pelargonium hortorum. In vitro, 12: 602-604.

AGHION-PRAT D., 1965. Néoformation de fleurs in vitro chez Nicotiana tabacum L. Physiol. Vég. 3: 229-303.

BARBIER M. et H.L. DULIEU, 1980. Effets génétiques observés sur des plantes de Tabac régénérées à partir de cotylédons par culture in vitro. Ann. Amélior.Plantes, 30: 321-344.

BARBIER M. et H. DULIEU, 1983. Early occurence of genetic variants in protoplast cultures. Plant Sci. Let. 29: 201-206.

BANNEROT H., L. BOULIDARD, Y. CAUDERON et T. TEMPE, 1974. Transfert of cytoplasmic male sterility from Raphanus sativus to Brassica oleracea. Proc. Eucarpia Meeting Crucifera, Crop Sect. 25: 52-54.

BELLIARD G., G. PELLETIER, 1978. Hybridation cytoplasmique par fusion de protoplastes chez Nicotiana tabacum. Physiol. Vég. 16: 441-448.

BELLIARD G., F. VEDEL et G. PELLETIER, 1979. Mitochondrial recombinaison in cytoplasmic hybrids of Nicotiana tabacum by protoplast fusion. Nature 281: 401-403.

BERBEC J., 1974. A cytoplasmic male sterile mutation form of Nicotiana tabacum L. Z. Pflanzenzucht 73: 204-216.

BINDING H. 1971. Organogenese an kallus von Petunia hybrida. Z. Pflanzenphysiol. 65: 359-364.

BOURGIN J.P. et J.P. NITSCH, 1967. Obtention de Nicotiana haploïdes à partir d'étamines cultivées in vitro. Ann.Physiol.Vég. 9: 377-382.

BRETTELL R.I.S., R. THOMAS et D.S. INGRAM, 1980. Reversion of Texas male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile, T-toxin resistant plants. Theor. Appl. Genet. 58: 55-58.

BURK L.G., 1960. Male-sterile flower anomalies in interspecific tobacco hybrids. J.Hered. 51: 27-31.

BURK L.G., 1967. An interspecific bridge cross: Nicotiana repanda through N. sylvestris to N. tabacum. J.Hered. 58: 215-218.

CABANNE F., J. MARTIN-TANGUY et C. MARTIN, 1977. Phénolamines associées à l'induction florale et à l'état reproducteur du Nicotiana tabacum var. xanthi n.c. Physiol.vég. 15: 439-453.

CAMERON D.R. et R. MOAV, 1957. Inheritance in Nicotiana tabacum . XXVII. Pollen Killer, an alien locus inducing abortion of microspores not carrying it. Genetics 42: 326-335.

CAPPADOCIA M. et K.S. RAMULU.1980. Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and stem internodes in an interspecific hybrid, Lycopersicon esculentum L. x L. peruvianum Mill. and cytogenetic analysis of the regenerated plants. Plant Sci.Let. 20: 157-166.

CHAILAKHYAN M.Kh., N.Ya. GRIGOR'EVA et V.N. LOZHNIKOVA, 1977. Effect of leaf extracts from flowering tobacco plants on the flowering of Chenopodium rubrum shoots and seedling. Dokl.Akad.Nauk.SSSR. 236: 773-776.

CHAPLIN J.F., 1964.Use of male-sterile tobaccos in the production of hybrid seed. Tob.Sci. 8: 105-109.

CHAPLIN J.F. et Z.T. FORD, 1965. Agronomic and chemical characteristics of Male-sterile Flue-Cured Tobacco as influenced by cytoplasms of Different Nicotiana species. Crop Sci. 5: 436-438.

CLAUHS R.P. et P. GRUN, 1977. Changes in plastid and mitochondrion content during maturation of generative cells of Solanum (Solanaceae). Amer.J.Bot. 64: 377-383.

CHLYAH H. 1974a. Inter-tissue correlations in organ fragments. Plant Physiol. 54: 341-348.

CHLYAH H., 1974b. Etude morphogénétique, histologique et caryologique de l'organogenèse au niveau des tissus superficiels d'un segment de tige de Torenia fournieri Lind. cultivé in vitro. Approches quantitatives. Thèse Doctorat d'Etat, Paris VI,115 p.

CHOUARD P. et D. AGHION, 1961. Modalités de la formation de bourgeons floraux sur des cultures de segment de tige de Tabac. C.R.Acad.Sci., Paris, 252: 3864-3866.

CHOUARD P. et M. TRAN THANH VAN, 1970. L'induction florale et la mise à fleur en rapport avec la méristématisation et en rapport avec la levée de la dominance apicale. Dans : "Cellular and Molecular of Floral induction (Bernier ed.), 449-461.

CLAPHAM D., 1971. In vitro development of callus from the pollen of Lolium and Hordeum. Z.Pflanzenzucht. 65: 285-292.

CLAPHAM D., 1973. Haploid Hordeum plants from anthers in vitro. Z.Pflanzenzucht. 69: 142-155.

CLAUSEN R.E. et D.R. CAMERON, 1950. Inheritance in Nicotiana tabacum: XIII. Duplicate factors for chlorophyll production. Genetics, 345: 4-10.

CLAYTON E.E., 1950. Male sterile tobacco. J.Hered. 41: 171-175.

COLEMAN R.E. et L.G.NICKELL, 1964. Stability of the flowering stimulus in isolated stem tips of sugar cane. Nature 201: 941-942.

COLLINS G.B., 1967. Long chromosomes in a Nicotiana species hybrid. Tob. Sci. 11: 173-174.

COLLINS G.B. et N.SUNDERLAND, 1974. Pollen-derived haploids of Nicotiana knightiana, N.raimondii and N.attenuata. J.Exp.Bot. 25: 1030-1039.

COLLINS G.B., P.D. LEGG et M.K. ANDERSON, 1970. Cytophotometric determination of DNA content in Nicotiana megachromosomes. Can. J. Genet. Cytol. 12: 769-770.

COLLINS G.B., P.D. LEGG et M.J. KASPERBAUER, 1972. Chromosome numbers in anther-derived haploids of two Nicotiana species: N.tabacum L. et N.otophora Gris. J.Hered. 63: 113-118.

COMAMALA C., 1980. Le développement in vitro de l'ovule de tabac non fécondé. Doctorat 3e cycle, Paris VII, 63 p.

COUSSON A., 1980. Différenciation morphogénétique de novo à partir d'assises épidermiques et sous-épidermiques: influence des paramètres intrinsèques et physico-chimiques in vitro. Thèse Doctorat 3e cycle , Paris VI, 138 p.

DARIMONT E. et Th. GASPAR, 1972. A propos du nombre et du poids moléculaire des isozymes peroxydasiques de la racine de Lens culinaris. Soc.bot.Fr., Mémoires 1972 (coll. Morphologie): 211-222.

DEMARLY Y., 1977. Génétique et amélioration des plantes. Ed. Masson.

DERONNE M. et F.BLONDON, 1977. Mise en évidence chez le Perilla ocymoides L., plante de jours courts typique, d'un autre facteur de l'induction florale : les températures basses . Etudes de l'état induit acquis par la feuille en jours courts ou au froid. Physiol.vég. 15: 219-237.

DULIEU H., 1967. Etude de la stabilité d'une déficience chlorophyllienne induite chez le tabac par traitement au méthane sulfonate d'éthyle. Ann. Amélior. Plantes, 17: 339-355.

DULIEU H., 1963. Physiologie végétale : sur la fécondation in vitro chez le Nicotiana tabacum L. C.R.Acad.Sci. Paris, 256: 3344-3346.

DUNWELL J.M. et M.E.FERRY, 1973. The influence of in vivo growth conditions of Nicotiana tabacum plants on the in vitro embryogenic potential of their anthers. Dans: John Innes Annual Report, n°64.

DUNWELL J.M. et N.SUNDERLAND, 1975. Polen ultrastructure in anther cultures of Nicotiana tabacum .III. The first sporophytic division. J.Exp.Bot. 26: 240-252.

DUVICK D.N. 1965. Cytoplasmic pollen sterility in corn. Adv. Genet. 13: 1-56.

EDWARDSON J.R., 1970. Cytoplasmic male sterility. Bot.Rev. 36: 341-420.

FRANKEL R. et E. GALUN, 1977. Pollinisation mechanisms, reproduction and Plant Breeding. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

FRANKEL R., W.R.SCOWCROFT et P.R.WHITFIELD, 1979. Chloroplast DNA variation in isonuclar male sterile of Nicotiana. Mol.Gen.Genet. 169: 129-135.

GASPAR T., 1979. Des isoperoxydases comme marqueurs de la différenciation cellulaire et du développement chez les végétaux. Xe rencontre de Méribel sur la différenciation cellulaire, pp. 175-199.

GASPAR Th., A.A. KHAN et D. FRIES, 1973. Hormonal control of isoperoxidasesin lentil embryogenic axis. Plant Physiol. 51: 146-149.

GENGENBACH B.G., C.E. GREEN et C.M. DONOVAN, 1977. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5113-5117.

GERSTEL D.U., 1980. Cytoplasmic male sterility in Nicotiana. Tech. Bul. 263: 1-31 (N.C. Agr. Res. Serv.).

GERSTEL D.U. et J.A. BURNS, 1966. Chromosomes of unusual length in hybrids between two species of Nicotiana. In: Chromosomes Today (Olivier and Boyd Edinburg, eds.), 1: 41-56.

GERSTEL D.U. et J.A. BURNS, 1976. Enlarged euchromatic chromosomes (Megachromosomes) in hybrids between Nicotiana tabacum and N. plumbaginifolia. Genetica 46: 139-153.

GERSTEL D.U., J.A. BURNS et L.G. BURK, 1978. Cytoplasmic male sterility in Nicotiana, restoration of fertility, and the nucleolus. Genetics 89: 157-159.

GREEN C.E., 1977. Prospects for crop improvement in the field of cell culture. Hort. Sci. 12: 131-134.

GRUN P., 1970. Changes of cytoplasmic factors during the evolution of the cultivated potato. Evolution, 24: 188-198.

GRESSHOFF P.M. et C.H. DOY, 1972. Development and differentiation of haploid Lycopersicon esculentum. Planta 107: 161-170.

GUHA S. et S.C. MAHESHWARI, 1964. In vitro production of embryos from anthers of Datura. Nature 204: 497-498.

GUHA S. et S.C. MAHESHWARI, 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of Datura in vitro. Nature 212: 97-98.

GUO C., 1972. Effect of chemical and physical factors on the chromosome number in Nicotiana anther callus cultures. In vitro, 7: 381-386.

HACCIUS B., N.N. BHANDARI et G. HAUSNER, 1974. In vitro transformation of ovules into rudimentary pistils in Nicotiana tabacum. J. Exp. Bot. 25: 695-704.

HART G.E. 1964. Cité par Smith, 1968.

HANGOC K.A. 1975. Analyse, au niveau des couches tissulaires minces excisées et cultivées in vitro de quelques types de corrélations intertissulaires et explant/milieu. Approches physiologiques et biochmiques. Thèse Doctorat 3e cycle, Paris VI, 149 p.

HAVEL L. et F.J. NOVAK, 1981. In vitro pollination of Maize (Zea mays L.). Proof of double fertilisation. Plant Cell reports 1: 26-28.

HICKS G.S. et A. McHUGHEN, 1977. Ovule development in vitro from isolated tobacco placental tissue. Plant Sci. Let., 8: 141-145.

HESLOP-HARRISON J., 1956. Auxin and sexuality in Cannabis sativa. Physiol. Plant.,9: 588-597.

IGNART F., 1981. Mise en évidence de quelques facteurs agissant sur l'organogenèse de Petunia à partir d'assises cellulaires épidermiques, sous-épidermiques et parenchymateuses cultivées in vitro. D.E.A. Paris Sud, 42 p.

IZARD C. et H. HITIER, 1955. Observations sur un hybride complexe, susceptible de produire des plantes à stérilité mâle. Ann. Inst. Expt. Tabac Bergerac, 2: 93-105.

KAHLEM G., A. CHAMPAULT, J.P. LOUIS, M. BAZIN, A. CHABIN, M. DELAIGUE, B. DAUPHIN, R. DURAND et B. DURAND, 1975. Détermination génétique et régulation hormonale de la différenciation sexuelle chez Mercurialis annua L. Physiol. Vég., 13: 763-779.

KAMATE K., A. COUSSON, T.H. TRINH et K. TRAN THANH VAN, 1981. Influence des facteurs génétique et physiologique chez le Nicotiana sur la néoformation in vitro de fleurs à partir d'assises cellulaires épidermiques et sous-épidermiques. Can.J.Bot. 59: 775-781.

KAMEYA T. et K. HINATA, 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of Brassica. Jap.J.Breed. 20: 82-87.

KELLER W.A. et K.C. ARMSTRONG, 1977. Embryogenesis and plant regeneration in Brassica napus anther cultures. Can.J.Bot. 55: 1383-1388.

KLIMASZEWSKA K. et W.A. KELLER, 1983. The production of haploids from Brassica hirta Moench (Sinapis alba L.) anther cultures. Z. Pflanzenphysiol. 109: 235-241.

KOSTOFF D., 1943. Cytogenetics of Nicotiana. State's Printing house. Sofia.

LEVINGS C.S. et D.R. PRING, 1976. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize. Science 193: 158-160.

LOBOTSKAYA L., Y.A. BYEKKO, L.A. PALCHENKO et V.Y. BORMOTO, 1968. Action of peroxydase and respiration intensity in sugar beet plants with different ploidy levels. Dokl.Akad.Nauk.SSSR. 12: 563-565.

LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193: 265-275.

MADER M., 1975. Anderung der Peroxidase isoenzynmuster in Kallus-ulturen in Abhangigkeit von der Differenzierung. Planta Medica suppl. 153-162.

MAJUMDAR S.K., 1970. In vitro culture of flower bud of Haworthia and Astroloba. Phyton, 27: 31-34.

MATSUBAYOSHI M. et S. MISOO, 1977. Studies on the mechanisms of pollen embryogenesis. Sci.Rept.Fac.Agr.Kobe Univ. 12: 173-181.

Mc CLINTOCK B., 1944. Relation of homozgyous deficiences to mutations and allelic series in maize. Genetics, 29: 478-502.

MEIMETH T., K. TRAN THANH VAN, J.L., MARCOTTE, T.H. TRIN et A.E. CLARKE, 1982. Distribution of lectins in tissues, derived callus and roots of Psophocarpus tetragonolobus (Winged bean). Plant Physiol., 70: 579-584.

MENCZEL L., G. GALIBA, F. NAGY et P. MALIGA, 1982. Effect of radiation dosage on efficiency of chloroplast transfer by protoplast fusion in Nicotiana. Genetics 100: 487-495.

MEYER V.G., 1975. Male sterility from Gossypium harknessii. J.Hered. 66: 23-27.

MIGINIAC E. 1971. Influence des racines sur le développement végétatif ou floral des bourgeons cotylédonaires chez le Scrofularia arguta : rôle possible des cytokinines. Physiol. Plant. 25: 234-239.

MOAV R., 1957. Somatic chromosome instability in Nicotiana hybrids. Ph.D.Univ.California.

MUIR W.H. 1965. Influence of variation in chromosome number on differentiation in plant tissue cultures. Proceed.internat.Conf.plant tissue cultures (White et Grove, eds). Mc Cuthran Corp. Pub. 485-492.

MURASHIGE T. et F. SKOOG, 1962. Revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant. 15: 473-497.

MURASHIGE T. et R. NAKANO, 1965. Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence. Amer.J.Bot. 52: 819-827.

NAKAMURA A. et R.ITAGAKI, 1973. Anther culture in Nicotiana and the characteristics of the haploid plants. Jap.J.Breed. 23: 71-78.

NAKATA K. et M. TANAKA, 1968. Differentiation of embryoids from developing germ cell in anther culture of tobacco. Jap.J.Genet. 43: 65-71.

NIIZEKI H. et K. OONO, 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc.Jap.Acad. 44: 451-457.

NIIZEKI H. et K. OONO, 1971. Rice plants obtained by anther culture. Coll.Internat. CNRS n°193, Strasbourg, France. "Les cultures de tissus de plantes" : 251-257.

NIIZEKI M. et F. KITA, 1975. Production of aneuploid plants by anther culture in Nicotiana tabacum L. Jap. J. Breed., 25: 52-58.

NITSCH C., 1968. Effects of growth substances on the induction of flowering of a short-day plant in vitro. In "Biochemistry and physiology of plant growth substances (Wightman and Setterfield, eds.) pp. 1385-1398.

NITSCH J.P., 1951. Growth and development in vitro of excised ovaries. Am.J.Bot. 38: 566-577.

NITSCH J.P., 1969. Experimental androgenesis in Nicotiana. Phytomorphology 19: 389-404.

NITSCH J.P., 1971. La production in vitro d'embryons haploïdes: résultats et perspectives. Coll. Internat. CNRS nº193, Strasbourg, France. "Les cultures de tissus de plantes": 281-294.

NITSCH C.et J.P. NITSCH, 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of Plumbago indica L. II. The production of reproductive buds. Planta 72: 371-384.

NITSCH J.P. et C. NITSCH, 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85-87.

NOVAK F.J. et B. VISKOT, 1974. Průzkum schopnosti tvorby haploidnich rostlin, v prāsnikových Kulturách in vitro v raemi rodu Nicotiana L. a kultivarú N. tabacum L. Universita Komenského Brastilave, Kolokvium o rastlinných explántatových Kulturách Stupy pri pezinku, 109-118.

NGUYEN T.T.T. et E.V. de GUZMAN, 1983. Formation of pollen embryos in cultured anthers of coconut (Cocos nucifera L.). Plant Sci.Let. 29: 81-88.

OGAWA Y. et R.W. KING, 1979. Indirect action of Benzyladenin and other chemicals on flowering of Pharbitis nil Chois. Plant physiol. 63: 643-649.

OGDEN E.C., 1974. Manual for sampling airborne pollen. Hafner Press, New York.

OHKI S., C. BIGOT et J. MOUSSEAU, 1978. Analysis of shoot forming capacity in vitro in two lines of tomato (Lycopersicon esculentum Mill) and their hybrids . Plant & Cell Physiol. 19: 27-42.

OUEDRAOGO K. 1978. Cité par TRAN THANH VAN et TRINH, 1978.

PAULET P. et J.P. NITSCH, 1964. Néoformation de fleurs in vitro sur des cultures de tissus de racines de Cichorium intybus L. C.R.Acad.Sci., Paris 258: 5952-5955.

PELLETIER G. et A. PELLETIER, 1971. Culture in vitro de tissus de trèfle blanc (Trifolium repens): variabilité des plantes régénérées. Ann. Amélior. Plantes, 21: 221-233.

PELLETIER G., C. RAQUIN et G. SIMON, 1972. La culture in vitro d'anthères d'asperge (Asparagus officinalis). C. R. Acad. Sci., Paris, 274: 848-851.

PICARD E., 1973. Influence de modifications dans les corrélations internes sur le devenir du gamétophyte mâle de Triticum aestivum L. in situ et en culture in vitro. C.R.Acad.Sci., Paris 277: 777-780.

PICARD E. et J. de BUYSER, 1973. Obtention de plantules haploïdes de Triticum aestivum L., à partir d'anthères in vitro. C.R.Acad.Sci., Paris 277: 1463-1466.

PICARD E. et J. de BUYSER, 1975. Nouveaux résultats concernant la culture d'anthères de Triticum aestivum L. Conditions de régénération des plantes haploïdes et production de lignées entièrement homozygotes. C.R.Acad.Sci., Paris 281: 989-992.

PIERIK R.L.M., 1966. The induction and initiation of flower buds in vitro in tissues of Lunaria annua L. Naturwissenschaften 53:45.

PREVOT P., 1939. Les facteurs de la morphogenèse des bourgeons de néoformation chez Begonia rex. Bull.Assoc.Fr.Av.Sci. 63e session : 611-619.

PRING D.R. et C.S. LEVINGS, 1978. Heterogeneity of Maize cytoplasmic genomes among male-sterile cytoplasms. Genetics 89: 121-136.

QUETIER F. et F. VEDEL, 1977. Heterogeneous population of mitochondiral DNA molecules in higher plants. Nature 268: 365-368.

QUOIRIN M., P. BOXUS et T. GASPAR, 1974. Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature Prunus plants. Physiol. Vég., 12: 165-174.

RAGHAVAN V., 1961. Studies on the floral histogenesis and physiology of Perilla. III. Effects of indoleacetic acid on the flowering of apical buds and explants in culture. Am.J.Bot. 48: 870-876.

RAGHAVAN V., 1976. Role of the generative cell in androgenesis in Henbane. Science 191: 388-389.

RAMAVARMA K.T.,K. Apparao et A.I. NARAYANAN. 1978. Male sterile flower anomalies in an interspecific Nicotiana hybrid. Tob.Res. 4: 29-33.

RAQUIN C. et V.PILET, 1972. Production de plantules à partir d'anthères de Pétunias cultivées in vitro. C.R.Acad.Sci., Paris 274: 1019-1022.

RHOADES M.M., 1938. Effect of the Dt gene on the mutability of the a_1 allele in maize. Genetics, 23: 377-397.

REDEI G.P. 1975. Genetic mechanisms in differentiation and development. Dans: Genetic manipulations with plant material (Ledoux ed.) , Nato Adv.Study Inst.Sec., ser.A vol. A_3 : 183-209.

REDDY M.M. et E.D. GARBER, 1971. Genetic study of variant enzymes. III. Comparative electrophoretic study of esterases and peroxidases for species, hybrids, and amphiloids in the genus Nicotiana. Bot. Gaz., 132: 158-166.

ROSSINI L.M.E. et J.P. NITSCH, 1966. Induction de la floraison chez une plante de jours courts Streptocarpus nobilis. C.R.Acad.Sci., Paris 263: 1379-1382.

SACRISTAN M.D. et G. MELCHERS, 1969. The caryological analysis of plants regenerated from tumorus and other calus cultures of tobacco. Molec.Genet. 105: 317-333.

SAGE G.C., 1976. Nucleo-cytoplasmic relationships in wheat. Adv.Agron. 28: 267-300.

SAN NOEUM L.H., 1976. Haploïdes d'Hordeum vulgare L. par culture in vitro d'ovaires non fécondés. Ann. Amélior. Plantes, 26: 751-754.

SAND S.A., 1968. Genetic modification of cytoplasmic male sterility in tobacco. J.Hered. 59: 175-177.

SAND S.A., 1978. Quantitative and qualitative effects of the debneyi system of cytoplasmic male sterility in Nicotiana. Genetics 88:86.

SAWHNEY V.K. et R.I. GREYSON, 1973. Morphogenesis of the stamenless-2 mutant in tomato. II. Modifications of sex organs in the mutant and normal flowers by plant hormones. Can. J. Bot., 51: 2473-2479.

SCANDALIOS J.G., 1974. Isoenzymes in development and differentiation. Annu. Rev. Plant Physiol., 25: 225-258.

SCHWEPPENHAUSER M.A. et T.J. MANN, 1968. Restoration of staminal fertility in Nicotiana by introgression. Can.J.Gen.Cytol. 10: 401-411.

SHEEN S.J., 1970. Peroxidases in the genus Nicotiana. Theor. Appl. Genet., 40: 18-25.

SIBI M., 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. II. Aspect expérimental. Ann.Amélior.Plantes 28: 523-547.

SIDOROV V.A., L. MENCZEL et P. MALIGA, 1981. Chloroplast transfer in Nicotiana based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. Planta 152: 341-345.

SMITH H.H., 1968. Recent cytogenetic studies in the genus Nicotiana. Adv.Genet. 14: 1-54.

SOPORY S.K. et S.C. MAHESHWARI, 1975. Morphogenetic potentialities of haploid and diploid vegetative parts of Datura innoxia. Z.Pflanzenphysiol. 77: 274-277.

SORESSI G.P. , E. GENTINETTA, M. ODOARDI et F. SALAMINI, 1974. Leaf peroxidase activities in tomato mutants affeting plant morphology. Biochem. Genet., 12: 181-198.

SOTTA B. et E. MIGINIAC, 1975. Influence des racines et d'une cytokinine sur le développement floral d'une plante de jours courts, le Chenopodium polyspermum L. C.R.Acad.Sci., Paris 281: 37-40.

SPETTOLI P., G. CACCO et G. FERRARI, 1976. Comparative evaluation of the enzyme multiplicity in a diploid, a triploid and a tetraploid sugar beet variety. J. Sci. Food Agric., 27: 341-344.

STRINGHAM G.R., 1974. Morphogenesis in span explants callus of haploid Brassica. Dans: Haploids in higher plants (Kasha, ed.). Univ.Guelph-Guelph. Canada: 143.

SUNDERLAND N. et J.M. DUNWELL, 1974. Pathways in pollen embryogenesis. Dans: Tissue culture and Plant Science, 1974 (Street, ed.,) 141-167.

SUNDERLAND N. et F.M. WICKS, 1969. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. Nature, 224: 1227-1229.

TABATA M. et F. MOTOYASHI, 1965. Heredity control of calus formation in maize endosperm cultured *in vitro*. Jap.J.Genet. 40: 343-355.

TANIMOTO S. et H. HARADA, 1979. Influences of environmental and physiological conditions on floral bud formation of *Torenia* stem segments cultured. Z. Pflanzenphysiol. 95: 33-41.

THORPE T.A., M. TRAN THANH VAN et Th. GASPAR, 1978. Isoperoxydases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation *in vitro*. Physiol. Plant. 44: 388-394.

TING Y.C., M. YU et W.Z. ZHENG, 1981. Improved anther culture of maize (*Zea mays*). Plant Sci.Let. 23: 139-145.

TORREY J.G., 1967. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long term plant tissue cultures. Physiol. Plant., 20: 265-275.

TSIKOV D. et E. TSIKOVA , 1971. Male sterility in back-crosses of reciprocal amphidiploids of *Nicotiana debneyi* Dom and *N. tabacum* with *N. tabacum* l. C.R.Acad.Sci.Agri.Bulg. 4: 17-19.

TSIKOV D. et E. TSIKOVA et V. NIKOVA, 1977. Male sterility in tobacco. III. On anther feminization. Genet. Plt. Breed., 10: 129-140.

TRAN THANH VAN-Le Kiem NGOC M., 1965. La vernalisation du *Geum urbanum* L. Etude expérimentale de la mise à fleurs chez une plante vivace en rosette exigeant le froid vernalisant pour fleurir. Ann.Sci.Nat.Bot. 12e série, VI, 3: 373-594.

TRAN THANH VAN M., 1973. Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. Planta 115: 87-92.

TRAN THANH VAN K. 1981. Control of morphogenesis in vitro cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 291-311.

TRAN THANH VAN M. et T.H. TRINH, 1978. Morphogenesis in thin cell layers: concept, methodology and results. Dans: Frontiers of Plant tissue culture 1978 (Thorpe, ed.). Univ.Calgary. Calgary Canada : 37-48.

TRAN THANH VAN M., NGUYEN THI DIEN et A. CHLYAH. 1974. Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L. Planta 119: 149-159.

TRINH T.H., 1977. Analyse des capacités morphogénétiques des organes formés de novo à partir de couches cellulaires minces de cellules épidermiques et sous-épidermiques. Thèse Doctorat 3e cycle, Paris VI, 70 p.

TRINH T.H. et K. TRAN THANH VAN, 1981. Formation in vitro de fleurs à partir de couches cellulaires minces épidermiques et sous-épidermiques diploïdes et haploïdes chez le Nicotiana tabacum L. et chez le Nicotiana plumbaginifolia Viv. Z.Pflanzenphysiol. 101: 1-8.

TRINH T.H. et K. TRAN THANH VAN, 1983. Influence de l'interaction génome - cytoplasme sur la formation de fleurs in vivo et in vitro chez les hybrides entre Nicotiana plumbaginifolia Viv. et Nicotiana tabacum L. Can.J.Bot. (sous presse)

TRINH T.H., T. GASPAR, K. TRAN THANH VAN et J.L. MARCOTTE, 1981. Genotype, ploidy and physiological state in relation to isoperoxidases in Nicotiana. Physiol. Plant., 53: 153-157.

VALLEE J.C., E. PERDRIZET et G. VANSUYT, 1969. Gradient d'induction florale et équilibre en acides aminés libres dans la tige du Nicotiana xanthi n.c. : influence des températures supraoptimales. C.R.Acad.Sci., Paris 269: 1190-1193.

VAN DE VOOREN J., 1969. The influence of high temperature on the flower inducing mechanism of Silene armeria L. I. Intermittent temperatures. Z.Pflanzenphysiol. 61: 135-139.

VAN HOOF P. et T. GASPAR, 1976. Peroxidase and isoperoxidase changes in relation to root initiation of Asparagus cultured in vitro. Sci. Hort., 4: 27-31.

VAZART B., 1973. Formation d'embryoïdes à partir de microspores de Tabac: évolution de l'infrastructure des cellules au cours de la première semaine de culture. Mém.Soc.Bot.Fr., Coll. Morphologie, 243-260.

VEDEL F. et C. MATHIEU, 1983. Physical and gene mapping of chloroplast DNA from normal and cytoplasmic male sterile (Radish cytoplasm) lines of Brassica napus. Current Genet. 7: 13-20.

VEDEL F., C. MATHIEU, P. LEBACQ, F. AMBARD-BRETTEVILLE et R. REMY, 1982. Comparative macromolecular analysis of the cytoplasms of normal and cytoplasmic male sterile Brassica napus. Theor. appl. Genet., 62: 255-262.

VENABLE J.M. et R. COGGESHALL, 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell. Biol. 25: 407-408.

VYSKOT B. et F.J. NOVAK, 1974. Experimental androgenesis in vitro in Nicotiana clerelandii Gray and N. sanderae Hort. Theor. Appl. Genet., 44: 138-140.

WANG C.C., C.C. CHU, C.C. SUN, S.H. WU, K.C. YIN et C. HSU, 1973. The androgenesis in wheat (Triticum aestivum) anthers cultured in vitro. Sci. Sin., 16: 218-222.

WARDELL W.L., 1976. Floral activity in solutions of DNA extracted from tobacco stems. Plant Physiol., 57: 855-861.

WHITE P.R., 1943. A handbook of plant tissue culture. Jacques Casttell Press, Lancaster, USA.

WILSON G.B. et A.H. SPARROW, 1960. Configurations resulting from iso-chromatid and iso-subchromatid union after meiotic and mitotic prophase irradiation. Chromosoma, 11: 229-244.

YAMADA T., T. SHOKI et Y. SINOTO, 1963. Formation of calli and free cells in the tissue culture of Tradescantia reflexa. Bot. Mag., 76: 332-339.

ZEEVAART J.A.D. et A. LANG, 1962. The relationship between gibberellin and floral stimulus in Bryophyllum daigremontianum. Planta, 58: 531.

ZENK M.H., H. EL-SHAGI, H. ARENS, J. STOCKIGT, E.W. WEILER et B. DEUS, 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of Catharantus roseus. In: Plant tissue culture and its biotechnological applications (W. BARS, E. REINHARD and M.H. ZENK, eds.), pp. 27-45. Springer, Berlin and New York.

ZHOU C. et H.Y. YANG, 1981. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. Plant Sci. Let. 20, 231-237.

ZHU Z.C. et H.S. WU, 1979. In vitro production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of Triticum aestivum and Nicotiana tabacum. Act. Genet. Sin., 6: 181-191.

Planche I

Photo 1- N.tabacum var. Samsun

RF = ramification florale

Photo 2- Fleurs de N.tomentosiformis (To),

de N.Sylvestris (Sy) et de leur hybride (H)

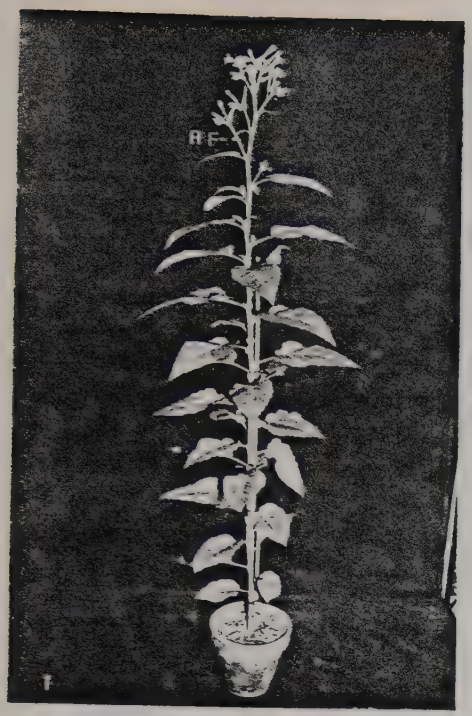
Photo 3- Feuilles de N. tomentosiformis (To), de N. sylvestris (Sy) et de leur hybride (H)

Photo 4- Fleurs de N. tabacum var. Samsun (T), de N. sylvestris (Sy) et leur hybride (H)

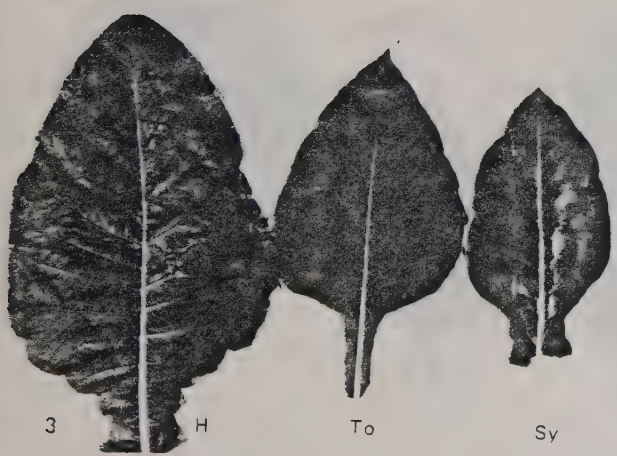
Photo 5- Feuilles de N. tabacum var. Samsun (T), de N. sylvestris (Sy) et de leur hybride (H)

Photo 6- Fleurs de N. tabacum var. Samsun (T), de N. tomentosiformis (To) et de leur hybride (H).

Photo 7- Feuilles de N. tabacum var. Samsun (T), de N. tomentosiformis (To) et de leur hybride (H).


F1
1

2
To
H
Sy


3
H
To
Sy

4
T
H
Sy

5
Sy
H
T

6
T
To
H

7
T
To
H

Planche II

Photo 8- *N. plumbaginifolia* diploïde (D) et haploïde (Ha)

Photo 9- Fleurs de *N. plumbaginifolia* (P), de *N. tabacum* var. Samsun (T) et de leur hybride interspécifique (PT).

Photo 10- Feuilles de *N. plumbaginifolia* (P), de *N. tabacum* var. Samsun (T) et de leur hybride interspécifique (PT).

Photo 11- Anthère stigmatoïde portant des ovules nus observée chez les plantes BC_3 $\{[2(pbg \times tab) \times tab] \times tab\} \times tab$

O = ovules nus

St = stigmate X 10

Photo 12- Anthère stigmato-pétaloïde portant des ovules nus observée chez les plantes BC_3 $\{[2(pbg \times tab) \times tab] \times tab\} \times tab$

O = ovules ST = stigmate PE = pétale X 10

Photo 13- Fleurs observées chez les plantes haploïdes issues de culture d'ovules nus des plantes $BC_3\{[2(pbg \times tab) \times tab] \times tab\} \times tab$

8

11

12

9

10

13

Planche III

Photos 14 à 17- Formation des sacs embryonnaires d'ovules nus chez les plantes BC_2 (PTTT x T)

Photo 14- Cellule sporogène en anaphase X 150

Photo 15- File des 4 macrospores X 150

Photo 16- Macrospore restant en diacinèse X 150

Photo 17- Sac embryonnaire

o = oosphère

c = cellule centrale

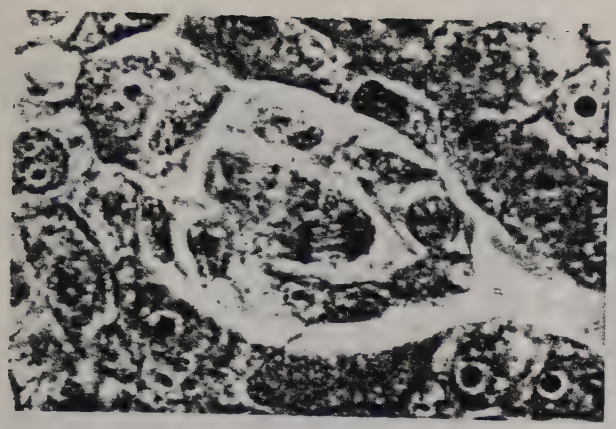
a = antipode X 150

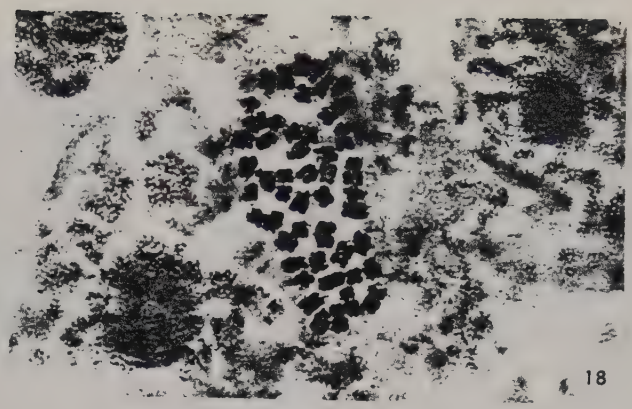
Photo 18- Chromosomes (50) observés dans la pointe racinaire des plantes $BC_2 = [2\ (pbg \times tab) \times tab] \times tab$ X 840

Photo 19- Chromosomes (25) observés dans la pointe racinaire des plantes $B'C_3 = \{[2(pbg \times tab) \times pbg] \times pbg\} \times pbg$ X 1300

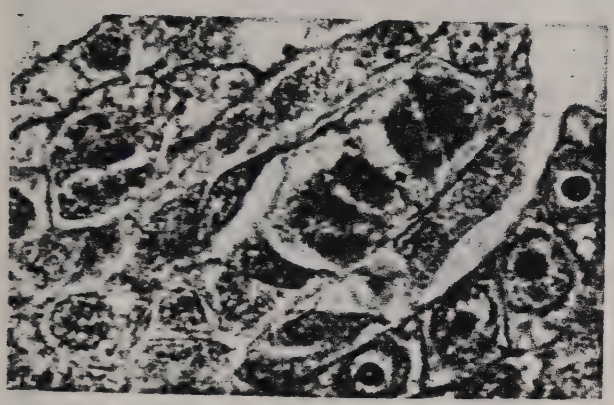
Photo 20- Métaphase I avec 2 univalents (flèche) observée chez les plantes $BC_2\ [2(pbg \times tab) \times tab] \times tab$ X 1100

Photo 21- Diacinèse avec 3 univalents (flèche) observée chez les plantes $B'C_3\ \{[2(pbg \times tab) \times pbg] \times pbg\} \times pbg$ X 1100



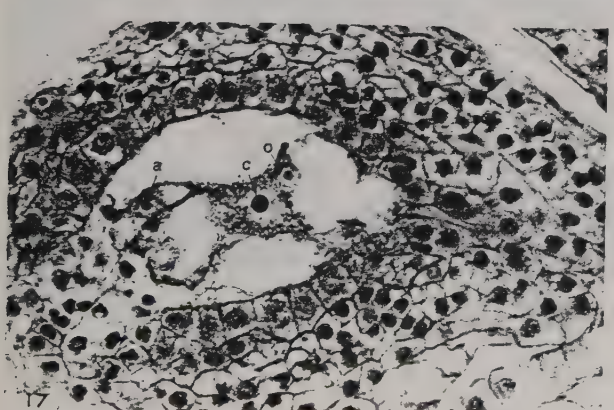


18

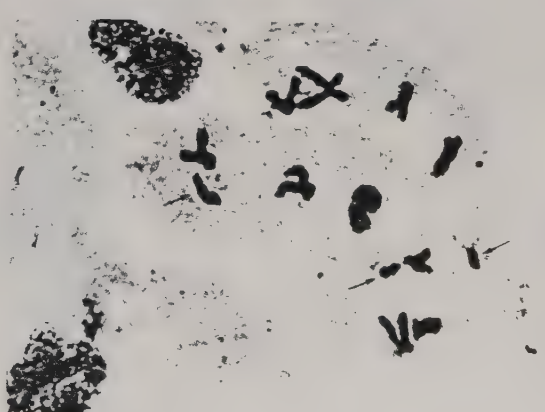


19

20



17



21

Planche IV

Photo 22- Pousses feuillées florales formées à partir d'un explant de N. plumbaginifolia F = fleur X 3

Photo 23- Fleurs sessiles formées à partir d'un explant de N. tabacum var. Samsun

F = fleur

E = épiderme X 5

Photo 24- Fleurs sessiles formées à partir d'un explant de BC_3 {[2(pbg x tab) x tab] x tab} x tab

F = fleur

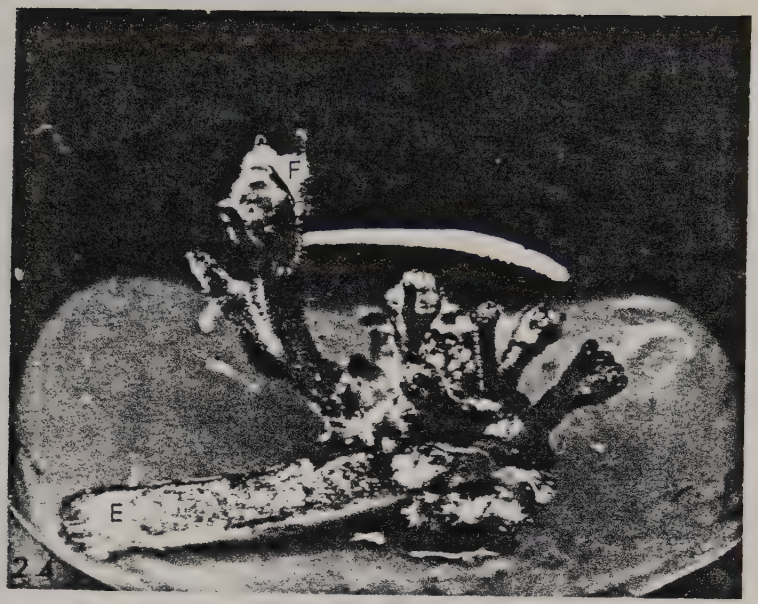
E = épiderme X 5

Photo 25- Pousses feuillées florales formées à partir d'un explant de $B'C_3$ {[2(pbg x tab) x pbg] x pbg} x pbg

F = fleur X 3

E = épiderme

22



24

23

25

Planche V

Androgenèse chez le N. tabacum var. Samsun

Photo 26- Microspores binucléés X 300

Photo 27- Régénération de cals puis de bourgeons à partir d'anthères cultivées sur le milieu "bourgeon"

A = anthère

B = bourgeon

C = cals X 2

Photo 28- Embryons obtenus à partir d'anthères cultivées sur le milieu "fleur" X 300

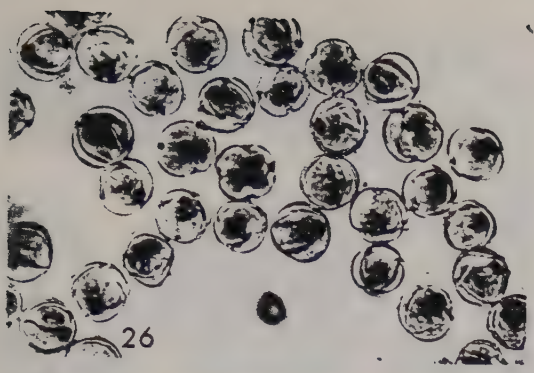
Photo 29- Plantes haploïdes obtenues à partir d'anthères cultivées sur le milieu "fleur" X 2

Photo 30- Chromosomes (24) observés dans la pointe racinaire d'une plante haploïde X 1200

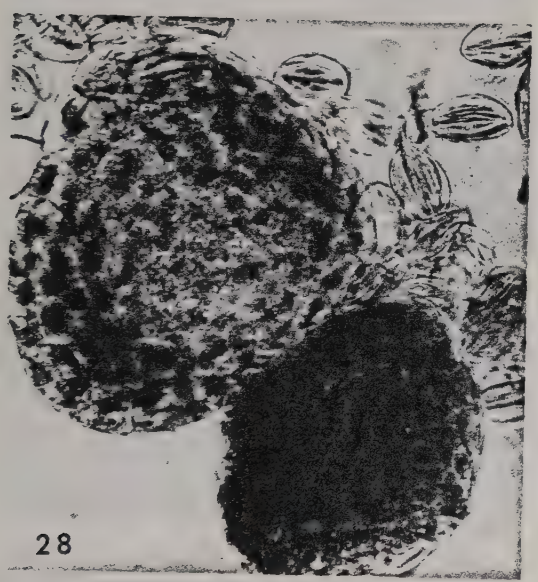
Photo 31- Associations chromosomiques (flèche) observées chez une cellule-mère de tétraspore de fleur haploïde formée in vitro X 1200

Photo 32- Plante hypohaploïde panachée

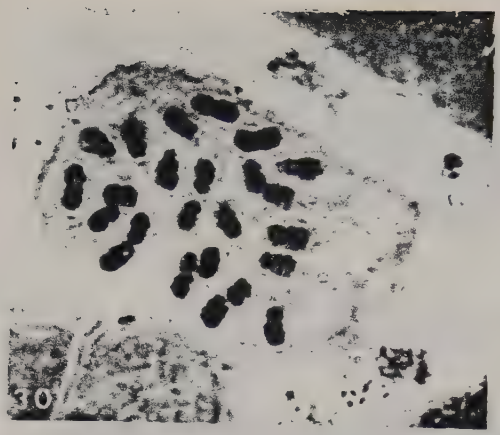
Photo 33- Chromosomes (12) observés dans la pointe racinaire d'une plante hypohaploïde X 1200


26

B
C
A
27


28

29


30

31

32

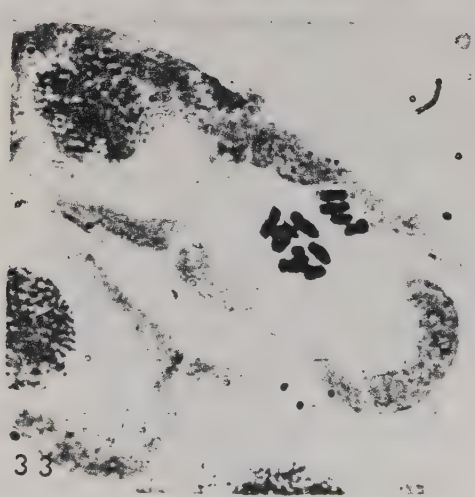

33

Planche VI

Photos 34 à 37- Plantes hypohaploïdes de N. tabacum var. Samsun

Photo 34- Chromosomes (3) observés chez une cellule-mère de tétraspore X 1200

Photo 35- Fleurs à pétales laciniés (T = témoin)

Photo 36- Anthère stigmatoïde

A = anthère

ST = stigmate

Fi = filet d'anthère X 10

Photo 37- Anthère pétaloïde

A = anthère

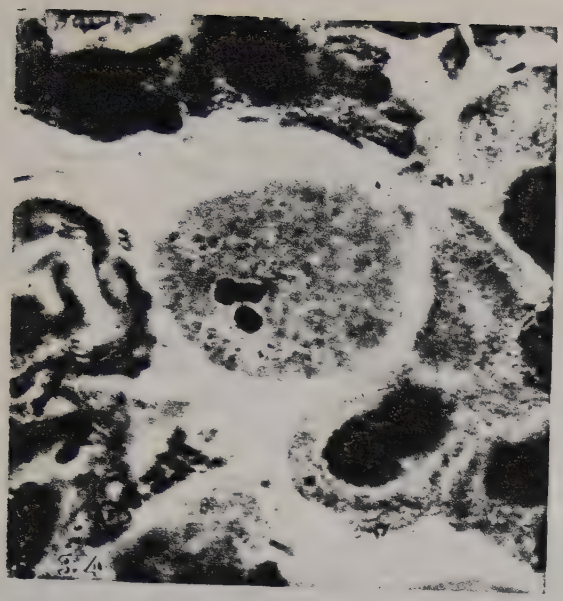
PE = pétale

Fi = filet d'anthère X 10

Photos 38 et 39-Nombres chromosomiques observés chez les plantes haploïdes de N. plumbaginifolia

Photo 38- Chromosomes (10) observés dans la pointe racinaire X 2600

Photo 39- Chromosomes (10) observés chez une cellule-mère de tétraspore X 2400



34

37

35

38

36

39

Planche VII

Photo 40- Ana-télophase II d'une cellule-mère de tétraspore d'une plante haploïde de *N. plumbaginifolia* X 2400

Photos 41 à 45- Plantes hypohaploïdes de *N. plumbaginifolia*

Photo 41- Plante panachée X 4

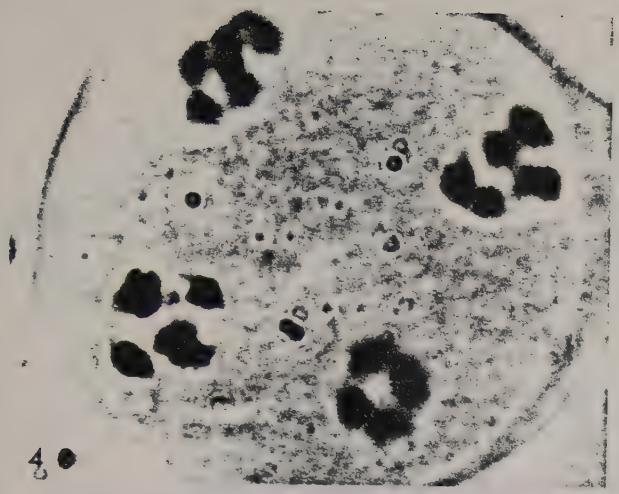
Photo 42- Plante albinos X 2

Photo 43- Fleurs à pétales laciniés X 3

(T = témoin)

Photo 44- Ovaire à feuilles carpellaires réduites laissant apparaître des ovules nus (O) X 12

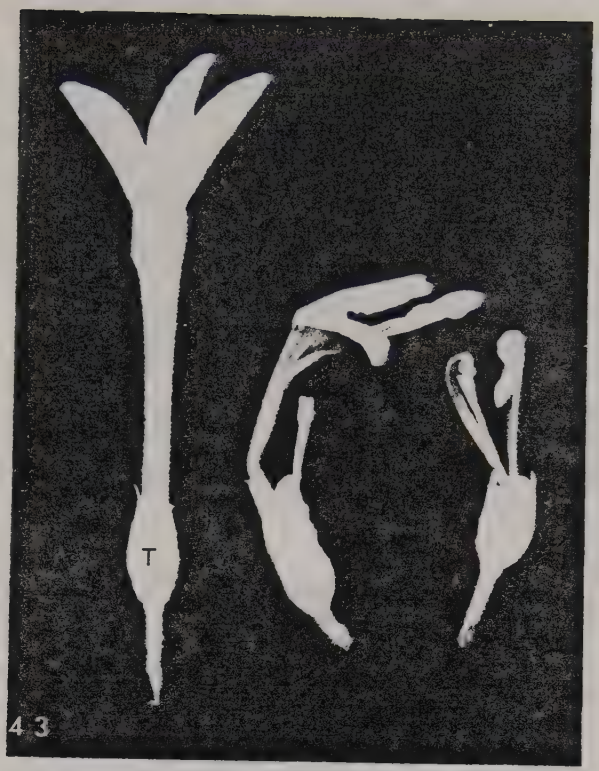
Photo 45- Chromosomes (8) observés dans la pointe racinaire X 1200



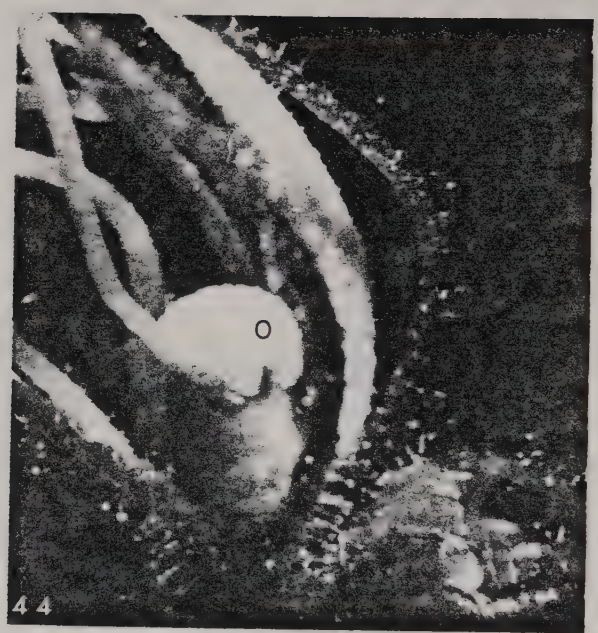
40

41

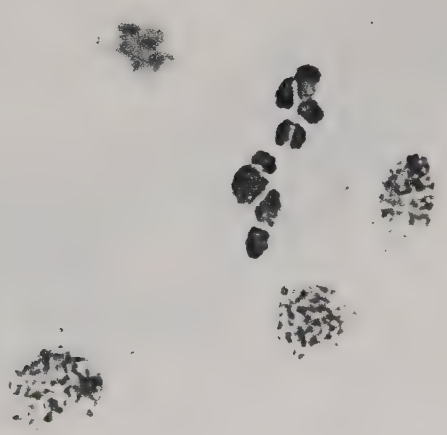
42



43



44



45

Planche VIII

Plantes hypohaploïdes de *N. plumbaginifolia*

Photo 46- Chromosomes (10) avec 1 bivalent (flèche) observés chez une cellule-mère de tétraspore X1200

Photo 47- Chromosomes (10) avec 4 bivalents (flèche) observés chez une cellule-mère de tétraspore X 1200

Photo 48- Métaphase I avec 5 chromosomes X 1200

Photo 49- Ana-télophase II X 1200

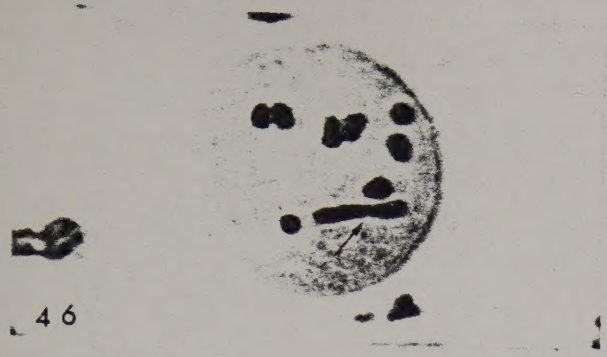
Photo 50- Télophase II avec des chromosomes de petite taille (flèche) à côté de chromosomes de taille normale X1200

Photo 51- Fin de télophase II avec 6 groupes de chromosomes X 2400

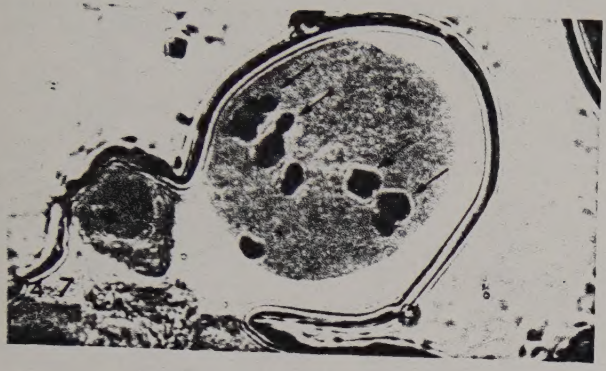
Photo 52- Grains de pollen de tailles inégales X 120

Photo 53- Chloroplaste de *N. plumbaginifolia* diploïde (témoin)
a = amidon X 1900

Photo 54- Proplaste de *N. plumbaginifolia* hypohaploïde albinos
v= vésicule X 1100



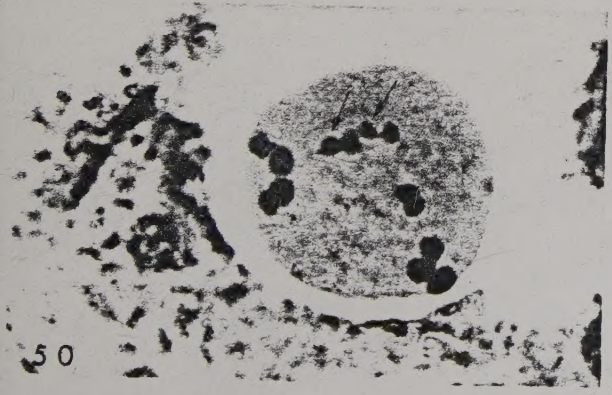
46



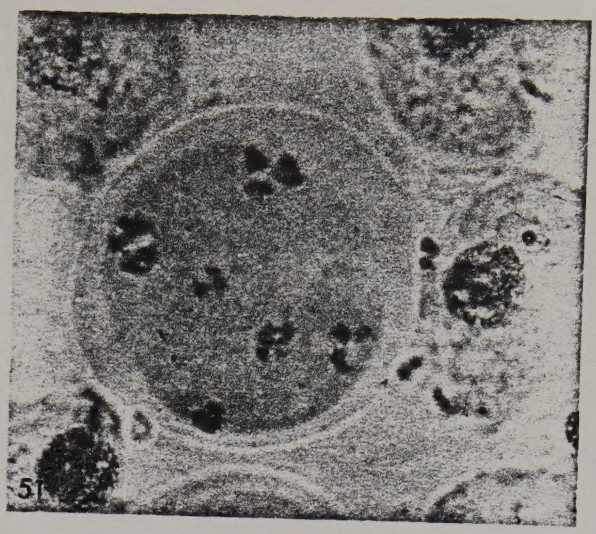
47

48

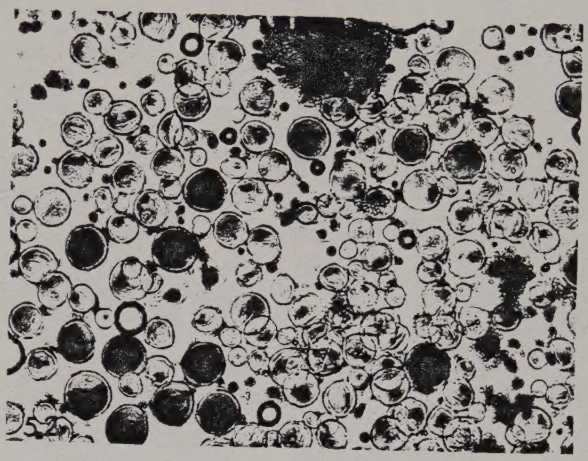
49



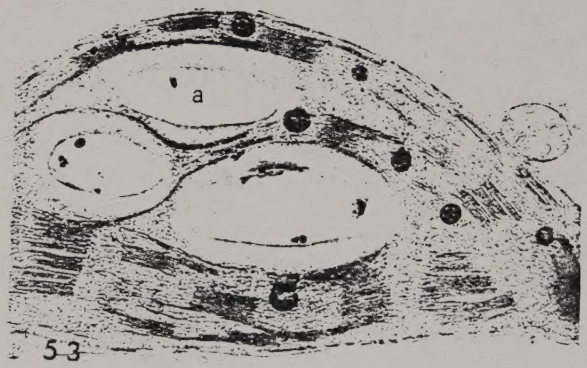
50



51



52



53

54